Charakterisierung der lysosomalen α-Glucosidase in Organen und Zellen von Föten und Erwachsenen

Josef Unterreithmeier

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546825_0007

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. Klaus Betke

Charakterisierung der lysosomalen α-Glucosidase in Organen und Zellen von Föten und Erwachsenen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Josef Unterreithmeier
aus Kraiburg am Inn
1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Jürgen Schaub
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Klaus Betke
Dekan:	Prof. Dr. Wolfang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

An dieser Stelle möchte ich all denen herzlich danken, die meine Arbeit ermöglicht und mir dabei in vielfältiger Weise geholfen haben.

Herrn Prof. Dr. J. Schaub gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Dissertationsthemas, für alle Anregungen und für die Geduld bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Betke danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Kinderklinik der Universität München im Dr. von Haunerschen Kinderspital.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Y.S. Shin für die freundliche Einführung in die biochemische Forschung und für die zahlreichen Ratschläge zu dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Herrn Dr. von Rücker für die freundschaftliche Unterstützung, die praktischen Hinweise, kritischen Diskussionen und ganz besonders für das Überlassen einer reinen Enzympräparation für meine Experimente.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
2	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	10
3	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	Reagentien	12
3.2	Geräte	13
3.3	Herstellung der Organproben	14
3.4	Leukozytengewinnung	15
3.5	Präparation von Amnionzellen und Fibroblasten	16
3.6	Proteinbestimmung	17
3.7	Bestimmung der Aktivität der α-Glucosidase	18
3.7.1	Enzymtest mit Maltose als Substrat	19
3.7.2	Enzymtest mit Maltotriose als Substrat	21
3.7.3	Enzymtest mit Glykogen als Substrat	21
3.8	Theoretische Grundlagen der Enzymkinetik	23
3.8.1	Die Michaelis-Menten-Beziehung	23
3.8.1.1	Zeitlicher Ablauf enzymkatalytisierter Reaktionen	23
3.8.1.2	Ableitung der Michaelis-Menten-Beziehung	26
3.8.1.3	Graphische Darstellung der Michaelis-Menten-Beziehung	28
3.8.2	Enzymhemmung	30
3.8.2.1	Kompetitive Hemmung	30
3.8.2.2	Substrathemmung	32
3.8.3	Katalyse eines Substrats durch zwei Enzyme	33
4	ERGEBNISSE	38
4.1	Optimierung der Testbedingungen	38
4.1.1	Aufbereitung der Gewebsproben	38
4.1.1.1	Einfluß der Zentrifugation	38
4.1.1.2	Zugabe von Merkaptoäthanol	39
4.1.1.3	Zellaufschlußverfahren	39
4.1.2	Enzymtest	40
4.1.2.1	Puffer	40
4.1.2.2	Reaktionsstopp	41

Seite

4.1.2.3 Verwendung von Halbmikroküvetten 41
4.1.2.4 Erstellung geeigneter Leerwerte 43
4.1.2.5 Inkubationszeit und Proteinkonzentration des Reaktionsgemisches 45
4.1.2.6 Einfluß von Ionen 47
4.1.2.7 Einfluß von Albumin 48
4.2 pH-Abhängigkeit der α-Glucosidase 49
4.2.1 Leber 49
4.2.2 Niere 53
4.2.3 Leukozyten 56
4.2.4 Amnionzellen 57
4.2.5 Fibroblasten 59
4.3 Vergleich der spezifischen Aktivität der α-Glucosidase aus den verschiedenen Proben 61
4.4 Enzymkinetische Eigenschaften der α-Glucosidase 64
4.4.1 Michaeliskonstante mit Maltose als Substrat 64
4.4.1.1 Leber 64
4.4.1.2 Niere 66
4.4.1.3 Leukozyten 68
4.4.1.4 Amnionzellen und Fibroblasten 69
4.4.2 Michaeliskonstante mit Maltotriose als Substrat 71
4.4.3 Michaeliskonstante mit Glykogen als Substrat 72
4.4.3.1 Leber 72
4.4.3.2 Niere 74
4.4.4 Hemmung der Enzymaktivität 75
4.4.4.1 Zugabe von Turanose 75
4.4.4.2 Zugabe von Glucose 79
4.4.4.3 Maltose als eigener Inhibitor (Substrathemmung) 79
5 DISKUSSION 82
6 ZUSAMMENFASSUNG 91
7 LITERATURVERZEICHNIS 92

1 EINLEITUNG

Die generalisierte Glykogenspeicherkrankheit wurde zum ersten Mal 1931 von Sprague, Bland und White (115) beschrieben. 1932 veröffentlichte der Holländer Pompe (94) einen Fall von der nach ihm benannten Krankheit. Im gleichen Jahr erschienen Arbeiten der Deutschen Putschar (98) und Bischoff (11). Cori (24) klassifizierte 1957 dieses Krankheitsbild als Glykogenose Typ II.

Die Häufigkeit der Glykogenosen beträgt in der BRD etwa 1 : 100.000 (106), wovon über 20% auf den Typ II entfallen; d.h. bei etwa 400.000 Geburten ist ein Fall mit Morbus Pompe zu erwarten. Das Fehlen der lysosomalen oder sauren α-Glucosidase und die Anhäufung von Glykogen mit normaler Struktur in den meisten Organen (55,118) stellen die wichtigsten pathologischen Merkmale dieser autosomal rezessiven Erbkrankheit dar.

Der Enzymdefekt wurde 1963 von Hers (51) entdeckt, der anhand von fünf Fällen nachwies, daß die saure α-1,4-Glucosidase - mit einem Aktivitätsoptimum bei pH 4,0 - in der Leber, dem Herz und der Skelettmuskulatur dieser Patienten fehlte. Seine Mitarbeiter Lejeune et al. (71) zeigten mittels Zellfraktionierung an Rattenleber, daß dieses Enzym in den Lysosomen lokalisiert ist. Den lysosomalen Charakter dieser Krankheit unterstrichen Baudhuin et al. (6) durch ihre elektronenmikroskopischen Studien, wo in Leberzellen Partikel verschiedener Form und Größe dargestellt wurden, die mit Glykogen gefüllt und von einer einfachen Membran umgeben waren. Diese abnormen Lysosomen wurden auch in der Niere (131), in Amnionzellen (59,85), Fibroblasten (58) und Lymphozyten (127) beobachtet, jedoch fehlte in einigen Fällen eine definierte Membran bei Glykogenanhäufungen in der Herz- und Skelettmuskulatur (21,50,55).

Die physiologische Rolle der sauren α-Glucosidase besteht in der Hydrolyse von Glykogen, das bei der Zellerneuerung durch Autophagie in die Lysosomen aufgenommen wird. Fehlt das Enzym, so resultiert daraus eine generalisierte Überladung des lysosomalen Systems, welche die anatomisch-klinischen Erscheinungen des Morbus Pompe verursacht.

Nachdem der Enzymdefekt bekannt geworden war, entdeckte man klinische Varianten, die bis dahin meistens als "atypische progressive Muskeldystrophien" oder "chronische Polymyositiden" verkannt waren. Je nach Krankheitsbeginn, Organbeteiligung und Progredienz unterscheidet man eine infantile, juvenile und adulte Variante.
Bei der klassischen infantilen Form - nur für sie wird die Bezeichnung Morbus Pompe angewandt - tritt bald nach der Geburt eine durch Glykogenanhäufung bedingte Herzvergrößerung auf, die charakteristische EKG-Veränderungen (50,60,72) hervorruft. Daneben besteht eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie mit typischen EMG-Zeichen (72,120). Weitere Symptome wie Makroglossie, Hepatomegalie (ohne erkennbare Funktionseinschränkung) und neurologische Defekte werden nicht bei allen Fällen beobachtet. Im allgemeinen sterben diese Patienten im ersten Lebensjahr an der Insuffizienz der kardialen und respiratorischen Muskulatur (33).
Bei der juvenilen Variante (14,20,25,63,95,120,133) besteht keine oder nur eine geringe kardiale Symptomatik. Als erstes Symptom zeigen sich im allgemeinen Gehschwierigkeiten, und der weitere Verlauf wird durch die zunehmende Schwäche der Skelettmuskulatur bestimmt. Patienten mit der adulten Form (2,22,38,53,69,72,108, 109,117) der Glykogenose Typ II weisen eine geringe Glykogenakkumulation in ihrer Skelettmuskulatur auf, und kardiale Symptome werden nicht festgestellt. Die Krankheit manifestiert sich im zweiten bis vierten

Lebensjahrzehnt durch eine zunehmende Muskelschwäche, die in den unteren Extremitäten beginnt, später auch die Schultergürtelmuskulatur betrifft. Eine Beteiligung der Atemmuskulatur kann jedoch auch im Erwachsenenalter eine respiratorische Insuffizienz als führendes Symptom hervortreten lassen, deren schubhafte Verschlechterung jederzeit zum Tod führen kann. Ansonsten ist die Prognose günstiger als die der infantilen und auch der juvenilen Verlaufsform; von Patienten mit einem Alter von über 60 Jahren ist berichtet worden (38,39,54).
Neuere Untersuchungen (32,77,100,109) ergaben bei adulten Patienten in verschiedenen Proben eine Restaktivität der sauren α-Glucosidase, welche für die unterschiedliche Expressivität der Krankheit verantwortlich sein soll.
Für diese ernste Krankheit, deren Prognose bei der infantilen Form infaust ist, steht bislang keine wirksame Behandlung zur Verfügung. Alle bisherigen therapeutischen Ansätze wie diätetische Maßnahmen in Form kohlenhydratarmer und eiweißreicher Diät, fruktosehaltiger Diät, Adrenalin- bzw. Epinephrin-Applikation sowie Cortison-Therapie zeigten keine wesentlichen Erfolge. Selbst die Verabreichung von saurer Maltase einschließlich Infusionen mit Enzymextrakten von menschlichen Geweben brachte nicht die erhoffte Besserung (29, 56,58,59,126). Es konnten zwar 70% der infundierten α-Glucosidase in der Leber nachgewiesen werden, doch hatte es dort oft nur einen geringen Effekt. Schwerwiegender ist die Tatsache, daß das Enzym zu den pathologisch-anatomisch entscheidenden Organen, Muskel und Herz überhaupt keinen Zutritt fand.

Die saure α-Glucosidase wurde bisher aus Rattenleber (3,71), Hundeleber (124) und Humanniere (3) angereichert. Reines Enzym wurde aus folgenden Geweben isoliert: Rattenleber (28,61), Kaninchenleber (7), Kaninchenmuskel (90), Rindermilz (42,43), Rinderleber (16),

Humanplazenta (28,99) und Humanleber (8,67,80,128). Die wichtigsten Schritte dabei sind eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und eine Gelfiltration auf einer Dextransäule, die das saure Enzym stark retardiert.

Das Enzym ist eine relativ unspezifische α-Glucosidase, die α-1,2-, α-1,3- und α-1,4-Glykosidbindungen hydrolisiert. Bevorzugt werden kurzkettige Maltosaccharide gespalten. Eine geringe, jedoch durchaus meßbare hydrolytische Aktivität gegenüber α-1,6-Bindungen wie z.B. bei Isomaltose und Pannose (15,16,61,90,124), befähigt das Enzym, Glykogen nicht nur, wie früher (51) angenommen, bis zu den Verzweigungen dieses Makromoleküls abzubauen, sondern es vollständig in Glucose umzusetzen (43,62,90). Dabei stellt die Spaltung der α-1,6-Bindung den geschwindigkeitslimitierenden Schritt dar.
Außer der hydrolytischen besitzt die saure α-Glucosidase noch Transglucosidase-Aktivität, für die allerdings recht hohe Substratkonzentrationen benötigt werden. Als Donorsubstrat wirkt dabei vor allem Maltose, Akzeptoren sind Glykogen, Maltose und andere Oligosaccharide (17, 28,61,91). Hers (51) fand, daß dabei die nichtreduzierende Hälfte von Maltose übertragen wird.
Aus der Beobachtung, daß sich Kationen auf die Enzymaktivität bei den Substraten Maltose und Glykogen unterschiedlich auswirken, schlossen verschiedene Autoren (62,90,91), daß zwei katalytisch aktive Bindungsstellen vorhanden sein müssen. Daß spezifische Antikörper nur die Katalyse von Glykogen vollständig hemmen können, während dies bei Oligosacchariden nur zum Teil (67) geschieht, scheint die obigen Feststellung zu unterstützen. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß das Glykogenmolekül durch seine Größe von einem in unmittelbarer Nähe gebundenen Antikörper räumlich daran gehindert wird, an die aktive Stelle zu gelangen, während dies für das kleine Maltosemolekül noch möglich ist (28).
Vor allem durch elektrophoretische Verfahren gelang es, aus der sauren α-Glucosidase-Fraktion verschiedene

Isoenzyme nachzuweisen (72,113,128), wobei zwischen den Organen teilweise verschiedene Enzymmuster zu sehen waren. Swallow et al. (121) zeigten mit Hilfe einer Affinitätselektrophorese, daß bei dem sauren Enzym mit einer Häufigkeit von 1 : 16 eine zweite Bande auftrat. Da die biochemischen Eigenschaften ebenso wie die Organverteilung identisch waren, zogen die Autoren daraus den Schluß, daß es sich um einen Polymorphismus handelt, der durch zwei Allele genetisch determiniert wird. Die dadurch gegebene Möglichkeit von drei Phänotypen wurde durch die Versuche bestätigt. Teng et al. (122) entdeckten 1979 eine weitere Variante.

Neben der lysosomalen sauren α-Glucosidase existieren noch verschiedene Formen einer "neutralen" α-Glucosidase mit einem pH-Optimum um 6,5 (43,125), deren Aktivität bei Patienten mit Morbus Pompe nicht beeinträchtigt ist. Bisher wurden hauptsächlich zwei Enzyme beschrieben:

1. Eine α-Glucosidase, die nur im neutralen pH-Bereich aktiv ist, wurde im Zytoplasma aller Gewebe und Zellen gefunden, in denen auch das saure Enzym enthalten ist. Sie wird im allgemeinen als zytoplasmatische neutrale α-Glucosidase bezeichnet, und besitzt dieselben hydrolytischen Eigenschaften gegenüber Oligosacchariden wie das saure Enzym; Affinität und Aktivität sind bei diesen Substraten oft sogar noch höher (23,124). Die Glucoamylaseaktivität (Glykogenabbau) wird dagegen als sehr niedrig beschrieben (4,13,23,43,51,124). Ein weiterer Unterschied ist die größere Thermolabilität der neutralen α-Glucosidase; sie wird sowohl durch Wärme (23, 44) als auch durch Gefrieren (111) verhältnismäßig leicht inaktiviert. Reindarstellungen dieses Enzyms wurden mit Hundeleber (124) und Kaninchenmuskel (23) durchgeführt.

2. In der Niere (30,125) und in Leukozyten (37) wurde eine α-Glucosidase gefunden, die in ihrem Verhalten von den vorher beschriebenen abweicht. Sie besitzt sowohl im sauren als auch im neutralen pH-Bereich eine verhältnismäßig hohe Aktivität nicht nur gegenüber Oligo-

saccharidien, sondern auch gegenüber Glykogen (31); außerdem bestehen immunologische Unterschiede. Das Enzym wird nach dem Gewebe, in dem es zuerst isoliert wurde, als renale α-Glucosidase bzw. Maltase bezeichnet.

Zur in vitro Bestimmung der Enzymaktivität werden neben den natürlichen Substraten Maltose und Glykogen - beide auch radioaktiv markiert - jetzt vor allem die synthetischen Substrate p-Nitrophenyl-α-D-glucosid (40) und 4-Methylumbelliferyl-α-D-glucopyranosid (44,103) wegen ihrer höheren Testempfindlichkeit verwendet.

Beim Menschen wurde die lysosomale α-Glucosidase in fast allen Organen nachgewiesen, wobei die Höhe der Aktivität in den einzelnen Geweben recht unterschiedlich ist (118). Auch in Zellen - eine Ausnahme bilden die Erythrozyten (130) - ist eine gut meßbare Aktivität vorhanden. In Leukozyten wurde sie zuerst von Huijing et al. (60) beschrieben; Fibroblasten gehören seit den Versuchen von Nitowsky und Grunfeld (89) zum festen Bestandteil der Diagnostik. Vor allem seit der Verwendung von synthetischen Substraten können Körperflüssigkeiten für experimentelle Untersuchungen genutzt werden. α-Glucosidase-Aktivität fand man im Plasma (111) und im Urin (41,76,79,93,104,109,111,112,113), der wegen seiner einfachen Verfügbarkeit besonders häufig untersucht wurde.
Nachdem man in Fruchtwasser α-Glucosidase-Aktivität gemessen hatte, glaubte man das ideale Material für eine pränatale Diagnose gefunden zu haben, die wegen der fehlenden Therapiemöglichkeiten große Bedeutung erlangt hatte.
1969 stellten Nadler und Messina (84) die erste in utero Diagnose eines Morbus Pompe aufgrund einer sehr niedrigen Fruchtwasseraktivität. Diese Diagnose war allerdings durch enzymatische Bestimmungen an Amnionzellkulturen aus diesem Fruchtwasser abgesichert worden.

Bei einem anderen Fall (26) stellte man trotz vorhandener Aktivität in unkulitiverten Amnionzellen später fest, daß ein Fall von Morbus Pompe vorlag. Die Autoren führten dies auf eine starke Blutkontamination des Fruchtwassers zurück. Weitere Arbeiten (12,18,40,44,85,86,88,102) betonten die Unbrauchbarkeit des Fruchtwassers zur pränatalen Diagnose, da auch bei eindeutigen Pompe-Fällen eine normale α-Glucosidase-Aktivität nachgewiesen worden war. Es handelt sich dabei wahrscheinlich nicht um eine lysosomale α-Glucosidase, sondern um Enzyme aus desquamierten intestinalen Zellen des Fötus (96) oder um "neutrale" Nierenenzyme, die mit dem Urin in das Fruchtwasser gelangen.
Um die Entscheidung für einen möglichen Schwangerschaftsabbruch möglichst schnell treffen zu können, wurden aufwendige Mikromethoden (46,47,87) entwickelt, die eine so geringe Anzahl von Zellen benötigen, daß schon 7-10 Tage nach einer Amniozentese Enzymbestimmungen aus einer Primärkultur möglich sind. Wegen der geringen Enzymaktivität in Primärkulturen sollten zur Vermeidung von Fehldiagnosen (88) bei diesen Methoden die gefundenen Werte mit gleich lang kultivierten Amnionzellen von Gesunden verglichen werden. Über einige erfolgreiche pränatale Diagnosen (12,57,58,88,107) mit Amnionzellen aus Subkulturen ist berichtet worden.

Aus der pränatalen Diagnostik ergab sich zum Teil die Zielsetzung dieser Arbeit. Denn obwohl es sich bei Amnionzellen um fötales Gewebe handelt, sind die genaueren Untersuchungen zu den Eigenschaften dieses Enzyms bisher nur an Tier- und Erwachsenenorganen durchgeführt worden. Lediglich zu einfachen Aktivitätsbestimmungen, d.h. um einen in utero oder klinisch diagnostizierten Morbus Pompe zu verifizieren, wurden fötale Organe untersucht.

Dabei ist es keineswegs selbstverständlich, daß die Enzymmuster von Föten mit denen von Neugeborenen oder Erwachsenen übereinstimmen (116). Während der verschiedenen Entwicklungsperioden des Organismus kann sich nicht nur die Aktivität eines Enzyms ändern, sondern auch die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat, welche durch die sogenannte Michaeliskonstante (78) ausgedrückt wird. Dies ist eine individuelle Konstante, welche zell- und organspezifischen Charakter hat. Ändert sie sich zu irgendeinem Zeitpunkt signifikant, so zeigt dies an, daß das Organ aus biologisch erforderlichen Gründen ein neues Enzymprotein zur Katalyse derselben Reaktion synthetisiert hat.

In dieser Arbeit werden die Aktivität, das pH-Optimum und kinetische Eigenschaften des Enzyms in Organen von menschlichen Föten untersucht und mit den Ergebnissen bei Erwachsenen verglichen. So soll die Frage geklärt werden, ob eine Aktivitätsentwicklung stattfindet und ob die fötale α-Glucosidase mit der adulten gleichgesetzt werden kann. Um den Umfang der Experimente in einem überschaubaren Rahmen zu halten, wurden die Untersuchungen auf einige Organe und Zellen beschränkt, die entweder für die Diagnostik große Bedeutung haben oder durch ein abweichendes Verhalten als besonders interessant erschienen.

1. Die Leber ist ein wichtiges Organ zur biochemischen Absicherung bei klinisch diagnostizierten Fällen, wobei mittels Stanzbiopsie eine Probe entnommen wird. Durch die hohe Enzymaktivität ist die Leber für kinetische Studien besonders gut geeignet. Dazu bieten viele Veröffentlichungen gute Vergleichsmöglichkeiten.
2. Von der Niere wird allgemein ein von den übrigen Organen abweichendes Verhalten berichtet. Bei Messungen in Nieren von Pompe-Patienten wurde eine normale oder fast normale Aktivität auch im sauren Bereich festgestellt (102,107,112,118). Nur bei einem Fall (93) wird eine sehr niedrige Aktivität erwähnt.

Außerdem wird das Nierenenzym von Turanose (107,118) und Antikörpern (67) weniger gehemmt als Enzyme von anderen Geweben. Es hat über einen weiten pH-Bereich (pH4 - 8) eine hohe Aktivität und unterscheidet sich z.B. vom Leberenzym auch elektrophoretisch (36,113).
3. Leukozyten stellen ein leicht zugängliches Untersuchungsmaterial dar, dessen Gewinnung weit weniger eingreifend ist als etwa eine Leber- oder Muskelbiopsie. Dieser Vorteil wird jedoch durch die vielen widersprüchlichen Ergebnisse relativiert, die in der Literatur festzustellen sind. Verfahren, die sogar heterozygote Merkmalsträger erfassen wollen und Aussagen von sehr niedriger oder fehlender Aktivität bei Pompe-Patienten (14,15,60,89,102,118) stehen Berichten gegenüber, die bei juvenilen und adulten Varianten normale, bei der infantilen Form nur wenig erniedrigte Werte gefunden hatten (66,69,93,101). Deshalb sollte der Versuch unternommen werden zu klären, inwieweit Leukozyten zur Diagnose geeignet sind.
4. Wie oben schon erwähnt, stützt sich die pränatale Diagnostik eines Morbus Pompe auf Aktivitätsmessungen von Amnionzellen, die aus Subkulturen gewonnen, sichere Aussagen ermöglichen. In dieser Arbeit sollte vor allem die Michaeliskonstante bestimmt werden, die soweit bekannt, in der Literatur noch nicht beschrieben wurde.
5. Als letzte Zellart wurden Fibroblasten verwendet, die wegen ihrer guten Kultivierungseigenschaften ein bevorzugtes Material für genetische Studien sind (92, 100,128).

Die Enzymbestimmungen wurden mit Maltose und teilweise Glykogen als natürlichen Substraten durchgeführt.

2 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
$NADP^+$	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
Gluconat-6-P	Gluconat-6-phosphat
HK	Hexokinase
G6P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
PCA	Perchlorsäure
MUFG	4-Methylumbelliferyl-α-D-glucopyranosid
SSW	Schwangerschaftswoche
E	Extinktion
ΔE	Extinktionsänderung ($E_{Probe}-E_{Leerwert}$)
ε	Extinktionskoeffizient
c	Konzentration einer Lösung
d	Schichtdicke der Küvetten
t	Zeit (Reaktions- bzw. Inkubationszeit)
v	Enzymaktivität
E	freies Enzym
E_t	insgesamt eingesetztes Enzym
S	freies Substrat
P	freies Produkt
I	freier Hemmstoff (Inhibitor)
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESS	Enzym-Substrat-Komplex mit zwei angelagerten Substratmolekülen
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
( )	molare Konzentration

k_1, k_3, k_5	Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Hinreaktion
k_2, k_4, k_6	Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Rückreaktion
K_m	Michaeliskonstante
K_i	Hemmkonstante (Inhibitionskonstante)
K_{ss}	Bindungskonstante bei Substrathemmung
v	Reaktionsgeschwindigkeit
v_t	gemeinsame Reaktionsgeschwindigkeit (Aktivitität) von zwei Enzymen
V	maximale Reaktionsgeschwindigkeit, Indices ergeben sich aus dem Zusammenhang
V_t	maximale Reaktionsgeschwindigkeit von zwei Enzymen

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Reagentien

Test-Combination Glucose (Hexokinase-Methode) mit Triäthanolaminpuffer, Magnesiumsulfat, NADP, ATP, Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; Perchlorsäure:
Boehringer, Mannheim

Glykogen (aus Säugetieren) Molekulargewicht 270.000 - 3.500.000:
Fluka AG, Buchs SG Schweiz

Natriumchlorid-Lösung isoton:
Fresenius KG, Bad Homburg

Albumin aus Rinderblut, Citronensäuremonohydrat, Essigsäure, Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, Glucose, Kaliumchlorid, Kupfersulfat, Magnesiumchlorid, Maltose, 2-Mercaptoäthanol, Natriumacetat, Natriumchlorid, di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat, Natriumkarbonat, Natronlauge, Seignettesalz:
E. Merck, Darmstadt

Thrombophob (Heparin):
Nordmarck

Dextran:
Serva GmbH, Heidelberg

Humanalbumin, Maltotriose, Turanose:
Sigma Chemical Co., München

3.2 Geräte

Photometer 1100 M
Rotationsmischer 3300
Thermostat 3401
Zentrifuge 3200:
Eppendorf Gerätebau Netheler + Hinz GmbH, Hamburg

Christ-Zentrifuge Typ UJ 2:
Martin Christ, Osterode/Harz

Sorvall SS-3 Automatic superspeed centrifuge
Rotor Type SM 24

Lauda-Thermostat Type K2

Potter-Elvehjem-Homogenisator (Glas-Teflon)

Sonifier B 10
Sonifer Converter Model L:
Branson Sonic Power, Danbury Connecticut USA

Präzisions-Küvetten aus optischem Spezialglas:
Hellma

3.3 Herstellung der Organproben

Die verwendeten Föten wurden von der II. Frauenklinik der Universität München zur Verfügung gestellt. Sie entstammten legalen Interruptiones, die durch Prostaglandin-Applikation eingeleitet wurden. Den augenscheinlich gesunden Föten wurden innerhalb der ersten Stunden die Organe entnommen, die bei -20°C bis zum Gebrauch eingefroren wurden. Die Erwachsenenorgane wurden im Institut für Rechtsmedizin der Universität München 6 - 10 Stunden nach dem Tod durch Autopsie entfernt, in kaltem Wasser kurz gewaschen und dann sofort tiefgefroren.

Zur Verarbeitung wurden die Organe aufgetaut, mit Filterpapier getrocknet und in kleine Stücke geschnitten, wobei Bindegewebsstränge und Kapselanteile weitgehend entfernt wurden. Das verbleibende Gewebe wurde im Verhältnis 1 : 5 (w/v) mit Aqua dest. in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator (97) aufgeschlossen. Um die Lysosomen zu zerstören und so die Enzyme möglichst vollständig in Lösung zu bringen, wurde das Homogenat (30 ml) viermal zehn Sekunden lang mit Ultraschall behandelt. Die Intensität und Dauer dieses Vorgehens hängen von der Menge des Extraktes ab; kleinere Mengen werden entsprechend kürzer beschallt. Dabei wurden ebenso wie bei der Homogenisierung die Gefäße mit den Proben in Eiswasser gekühlt, um einen Temperaturanstieg auf über 4 °C zu verhindern.

Anschließend wurde das Homogenat mit ca. 10.000 g 20 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert (Sorvall SS-3, 10.000 UpM). Vom entstandenen Überstand wurde die Fettemulsion verworfen und der restliche klare Überstand in Eppendorf-Reaktionsgefäße abpipettiert und bis zur Verwendung tiefgefroren.

.4 Leukozytengewinnung

Zur Isolierung der Leukozyten wurde die Dextran-Sedimentationsmethode (81) angewandt. Die Vorteile dieser Präparation bestehen in einer hohen Aktivitätsausbeute von 80 - 100%, einer adäquaten Zellzusammensetzung und einer geringen Kontamination mit Thrombozyten (132). Die Methode wurde in unserem Labor folgendermaßen modifiziert:
5 ml frisches Venenblut werden vorsichtig mit 1ml einer Lösung aus 5 g Dextran, 0,7 g NaCl und 50 mg Heparin auf 100 ml Aqua dest. vermischt. Das Gemisch läßt man eine Stunde bei Zimmertemperatur sedimentieren. Anschließend wird der Überstand, der neben dem Plasma noch die Leukozyten enthält, vorsichtig abgehoben und 15 Minuten mit ca. 200 g zentrifugiert (Christ-Zentrifuge, 1500 UpM); der neu gewonnene Überstand wird dekantiert. Um die noch im Sediment vorhandenen Erythrozyten zu zerstören, wird dieses mit 0,15 ml 1%iger Essigsäure etwa 15 - 30 Sekunden geschüttelt und dann sofort mit 0,7%iger Kochsalzlösung auf ca. 10 ml aufgefüllt. Nach erneutem Zentrifugieren wird die vorhergehende Prozedur wiederholt, falls noch Erythrozyten im Sediment zu erkennen sind. Nachdem es noch ein- bis zweimal mit Kochsalzlösung gewaschen wurde, werden die gereinigten Leukozyten in ca. 1 ml Aqua dest. suspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß abgefüllt. Die Zellen werden durch Ultraschall - viermal zwei Sekunden lang im Eiswasserbad - aufgebrochen. Als letzter Schritt wird noch zwei Minuten zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge), so daß die Zelltrümmer pelletieren. Der klare Überstand wird bei -20°C gelagert oder sofort zu Messungen verwendet.

3.5 Präparation von Amnionzellen und Fibroblasten

Die Amnionzellen und Fibroblasten wurden im genetischen Labor der Kinderpoliklinik München im HAMs F 10 Medium mit einem Zusatz von 20% fötalem Kälberserum gezüchtet. Sie stammten von Zellen, die entweder zur Chromosomenanalyse oder wegen anderer Stoffwechseldefekte kultiviert worden waren.
Bei der Aufbereitung wird zuerst das mit einem Farbindikator versehene Medium, das der Ernährung der Zellen während des Aufenthaltes im Brutschrank diente, aus den Kulturflaschen abgesaugt. Darauf wird der Zellrasen mit einigen ml physiologischer Kochsalzlösung gespült und die Flüssigkeit wieder abgesaugt, um abgestorbene Zellen zu entfernen, die zwar bei der Proteinbestimmung mit erfaßt würden, aber keine Enzymaktivität besitzen. Nach erneuter Zugabe von Kochsalzlösung werden die Zellen mit einem Gummischaber von der Unterlage gelöst und die Suspension wird in ein Reagenzglas pipettiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt, um möglichst alle Zellen zu erfassen. Anschließend wird die Zellsuspension 15 Minuten lang mit ca. 200 g zentrifugiert (Christ-Zentrifuge, 1500 UpM), der Überstand abgesaugt, das Sediment mit isotoner Kochsalzlösung aufgeschüttelt und auf etwa 10 ml aufgefüllt. Durch diesen Waschvorgang, der zwei- bis dreimal wiederholt wird, werden Verunreinigungen weitgehend beseitigt. Das letzte Sediment wird je nach Zellmenge in 0,5 - 1,0 ml Aqua dest. suspendiert.
Der Zellaufschluß mit Ultraschall und die Lagerung erfolgen wie unter Leukozytengewinnung beschrieben.

3.6 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration in den aufbereiteten Organen und Zellen wurden nach der Methode von Lowry et al. (74) gemessen, die in unserem Labor als geringfügig veränderte Mikromethode durchgeführt wird.
Dazu wurden die Proben aufgetaut und mit Aqua dest. verdünnt: die Organe 1 :100, die Zellen wegen des geringen Proteingehaltes nur 1 : 10.
Für die Bestimmung wird ein Kupferreagenz benötigt, das für jeden Versuch frisch angesetzt werden muß. Es wird wie folgt hergestellt: 0,01 ml einer Lösung von 5,5 g $CuSO_4$ mit Aqua dest. ad 100 ml werden mit 0,10 ml einer Lösung von 1,35 g Seignettesalz mit Aqua dest. ad 100 ml vermischt. Davon werden 0,1 ml zu 5,0 ml 2%iger $NaCO_3$-Lösung (in 0,1 n NaOH) gegeben.

Beim Testansatz werden 0,02 ml Probe in ein Reaktionsgefäß mit 0,2 ml Kupferreagenz pipettiert. Nachdem es 10 Minuten bei Raumtemperatur stand, gibt man 0,02 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz dazu, mischt und läßt die Gefäße weitere 30 bis 35 Minuten im Dunkeln stehen. Das Gemisch wird dann in eine Mikroküvette gefüllt, und in einem Photometer mit rotempfindlichem Multiplier wird die Extinktion bei 772 nm abgelesen.

Für die Bestimmung der Proteinwerte wird eine Standardkurve aus den Extinktionswerten bekannter Proteinkonzentrationen erstellt. Als Standard wird Rinderserumalbumin in Konzentrationen von 0,025 bis 0,5 mg/ml verwendet. Den Leerwert erhält man, indem die Probe durch Aqua dest. ersetzt wird.
Die Proteinwerte der Proben werden aus der Standardkurve abgelesen und ergeben nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die Proteinkonzentration der aufbereiteten Organe bzw. Zellen.
Bei allen Messungen wurden Doppelwerte bestimmt.

3.7 Bestimmung der Aktivität der α-Glucosidase

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Eigenschaft der α-Glucosidase, Maltose zu spalten bzw. endständige Glucosemoleküle von Glykogen abzutrennen, genutzt. Die auf diese Weise freigesetzte Glucose wird in einem zweiten Schritt mit Hilfe der spezifischen Hexokinase-Methode (9) bestimmt. Der Enzymtest erfolgt deshalb in zwei getrennten Schritten, weil die erste Reaktion bei einem pH von 4,0 abläuft, während die zweite bei pH 7,5 durchgeführt wird.

Das Testprinzip der Gesamtreaktion sieht wie folgt aus:

1. Freisetzung von Glucose durch Spaltung (Hydrolyse) von Maltose:

   $$\text{Maltose} \xrightarrow{\alpha\text{-Glucosidase}} \text{Glucose} + \text{Glucose}$$

2. Bestimmung der Glucose in einem optischen Test durch eine gekoppelte Enzymreaktion (Hilfsreaktion + Indikatorreaktion):

   $$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Gluose-6-phosphat} + \text{ADP}$$

   $$\text{Glucose-6-phosphat} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6P-DH}} \text{Gluconat-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Die Zunahme von NADPH wird photometrisch gemessen. Dies beruht auf der Tatsache, daß reduziertes $NADP^+$ (NADPH) Licht mit einem Maximum bei 340 nm absorbiert, während die oxydierte Form ($NADP^+$) zwischen 300 und 400 nm keine Resorption zeigt. Da der molare Extinktionskoeffizient für NADPH bekannt ist, kann die NADPH-Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz errechnet werden:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

Die Menge des entstandenen NADPH erhält man, indem man die errechnete Konzentration mit dem Volumen multipliziert. Dies entspricht der Hälfte an umgesetzter Maltose, da NADPH stöchiometrisch zur eingesetzten Glucose

entsteht, von der man zwei Moleküle aus einem Molekül Maltose erhält. Dividiert man diese Maltosemenge durch die Inkubationszeit der 1. Reaktion, so erhält man die Enzymaktivität, die als Substratumsatz pro Zeiteinheit unter genau festgelegten Versuchsbedingungen definiert ist.
Um die Aktivität mit anderen Proben vergleichen zu können, errechnet man die spezifische Aktivität, d.h. der Substratumsatz pro Zeiteinheit wird auf die eingesetzte Enzymmenge bezogen. Steht kein reines Enzym zur Verfügung, nimmt man statt dessen die Menge an Gesamtprotein.

Die spezifische Aktivität v errechnet sich somit nach:

$$v = \frac{\Delta E \cdot \text{Volumen (l)}}{\varepsilon_{NADPH}(l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}) \cdot d\ (cm) \cdot 2 \cdot t\ (min) \cdot \text{Protein (mg)}}$$

Die Enzymeinheit ist folgendermaßen definiert:
Ein Unit (U) entspricht der Enzymmenge, die ein mol Substrat pro Minute unter den angegebenen Bedingungen umsetzt.

3.7.1 Enzymtest mit Maltose als Substrat

Die tiefgefrorenen Proben wurden aufgetaut und mit Aqua dest. 1 : 5 bis 1 : 25 (v/v) verdünnt, so daß Proteinkonzentrationen von 0,4 - 2,5 mg/ml eingesetzt wurden. Zellproben brauchten wegen ihrer niedrigen Proteinkonzentration nicht weiter verdünnt zu werden.
Beim Testansatz werden 50 µl einer Substratlösung, die, falls nicht anders angegeben, 28 mM Maltose in 100 mM Natriumacetatpuffer pH 4,0 enthält, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Durch die Zugabe von 20 µl Probe wird die Reaktion gestartet. Im Reaktionsgemisch beträgt die Substratkonzentration 20 mM. Nach kurzem Mischen wird bei 37°C 60 Minuten lang in verschlossenen Reaktionsgefäßen inkubiert. Nur bei Zellproben mit niedriger Aktivität betrug die Inkubationsdauer bis zu 120 Minuten.

Die Reaktion wird mit 200 µl Perchlorsäure (ca. 0,3 N) beendet, und das denaturierte Protein durch zweiminütiges Zentrifugieren (Eppendorf-Zentrifuge) pelletiert. Der gewonnene klare Überstand wird anschließend zur Messung der Glucose verwendet.
Dazu werden nacheinander in Reaktionsgefäße pipettiert: 500 µl Triäthanolaminpuffer 0,3 M, pH 7,5, der 4 mM Magnisumsulfat enthält; 40 µl Probe (klarer Überstand); 40 µl NADP 12 mM; 40 µl ATP 15 mM; mit 10 µl Enzymgemisch (HK/G6P-DH beide ≧ 125 U/ml) wird die gekoppelte Enzymreaktion in Gang gesetzt. Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur und ist nach 15 Minuten beendet, d.h. die vorhandene Glucose ist vollständig umgesetzt worden.

Die Extinktion, bedingt durch die Zunahme von NADPH, wurde bei einer Wellenlänge von Hg 334 nm in Halbmikroküvetten aus optischem Spezialglas (Schichtdicke 1 cm) gemessen.
Mit geeigneten Leerwerten (s.4.1.2.4) wurde die schon vor der Maltosespaltung anwesende Glucose bestimmt und von den Probewerten subtrahiert.
Um unerwüschte Reaktionen zu vermeiden, wurden die Proben und Reagentien zwischen den einzelnen Arbeitsgängen in Eiswasser gekühlt.

Berechnung der spezifischen Enzymaktivität:
Sie erfolgt nach der o.a. Formel. Dabei muß noch berücksichtigt werden, daß von der gesamten Glucose, die nach dem Reaktionsstopp in 270 µl gelöst ist, nur 40 µl der Lösung im Glucosetest eingesetzt werden. Die Proteinmenge ergibt sich bei bekannter Proteinkonzentration der Proben (s. 3.6) aus dem Verdünnungsfaktor (5 bis 25) und dem eingesetzten Volumen von 20 µl.
Der molare Extinktionskoeffizient ε für NADPH bei einer Wellenlänge von Hg 334 nm beträgt $6{,}15 \cdot 10^3$ $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ (10).

Daraus folgt:

$$v = \frac{\Delta E \cdot 0{,}63 \cdot 10^{-3}\ l}{6{,}15 \cdot 10^{3}\ l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot 1\ cm \cdot 2 \cdot 60\ min \cdot 0{,}04\ ml} \cdot 0{,}27\ ml$$

$$\frac{\cdot\ \text{Verdünnungsfaktor der Probe (5-25)}}{\cdot\ \text{Proteinkonz. d. Probe } mg \cdot ml^{-1} \cdot 0{,}02\ ml}$$

Als Enzymeinheit ergibt sich:

$$mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1} \triangleq 10^{6}\ U \cdot mg^{-1}$$

3.7.2 Enzymtest mit Maltotriose als Substrat

Für Maltotriose wurde für einen Überschuß an Substrat angenommen, daß nur die Bindungen der nichtreduzierenden Endgruppen der Moleküle hydrolisiert werden und keine Glucose durch die Spaltung aus der im Verlauf der Reaktion entstehenden Maltose resultiert (23,90). Dadurch entfällt bei der Berechnung der Enzymaktivität der Faktor 2 im Nenner.
Ansonsten war der Testablauf der gleiche wie unter Maltose beschrieben; die Substratkonzentration betrug im Normalfall 10 mM.

3.7.3 Enzymtest mit Glykogen als Substrat

Da Glykogen durch Säuren gespalten wird, ist der Reaktionsstopp mit PCA bei Glykogen nicht möglich, wenn nicht alle Proben innerhalb von kurzer Zeit weiter verwendet werden können. Deshalb wurde die Beendigung der Reaktion auf Hitzeinaktivierung umgestellt.
Um eine Ungenauigkeit durch das kleine Volumen an Reaktionsgemisch (70 µl) zu vermindern, wurde dieses erhöht und außerdem am Ende der Inkubationszeit 200 µl Triäthanolaminpuffer dazugegeben. Dadurch konnte auch eine größere Menge an Probe im Glucosetest eingebracht werden.

Zu 100 µl Substratlösung werden 40 µl Probe gegeben und bei 37°C 60 - 120 Minuten inkubiert. Die Substratkonzentration im Reaktionsgemisch beträgt im allgemeinen 25 mg/ml. Der Reaktionsstopp erfolgt durch Zugabe von 200 µl Triäthanolaminpuffer und sofortigem Beginn einer Hitzedenaturierung bei 95°C für die Dauer von 3 Minuten. Anschließend werden die Proben in Eiswasser abgekühlt und 2 Minuten zentrifugiert.
Bei der Glucosebestimmung werden zu 500 µl Triäthanolaminpuffer 50 µl denaturierter Überstand der Probe, 50 µl NADP und 50 µl ATP pipettiert (Konzentrationen wie bei Maltose). Die Reaktion wird mit 10 µl Enzymgemisch (HK/G6P-DH) in Gang gesetzt. Die Messung der Extinktion erfolgt nach ca. 15 Minuten bei Hg 334 nm in Halbmikroküvetten.
Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt im Prinzip wie bei Maltose beschrieben; es ändern sich lediglich einige Werte für Volumina. Außerdem entfällt der Faktor 2 im Nenner.
Wegen des uneinheitlichen Molekulargewichts von Glykogen wird die Aktivität nicht als Substratumsatz pro Minute, sondern als Menge an freigesetzter Glucose pro Minute angegeben.

Für die Berechnung folgt:

$$v = \frac{\Delta E \cdot 0{,}66 \cdot 10^{-3}\ l \cdot 0{,}34\ ml}{6{,}15 \cdot 10^{3}\ l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot 1\ cm \cdot 60\ min \cdot 0{,}05\ ml} \cdot \frac{\text{Verdünnungsfaktor der Probe (5-20)}}{\text{Proteinkonz. d. Probe mg} \cdot ml^{-1} \cdot 0{,}04\ ml}$$

Bei allen Messungen wurden Doppelwerte bestimmt.

3.8 Theoretische Grundlagen der Enzymkinetik

Da ein wesentlicher Teil der Ergebnisse dieser Arbeit aus enzymkinetischen Untersuchungen besteht, erscheint es für deren Verständnis notwendig, einige Grundlagen der Enzymkinetik eingehender zu erläutern. Im folgenden werden die Michaelis-Menten-Beziehung - als einer der wichtigsten Größen in der Enzymkinektik- und einige Veränderungen dieser Beziehung abgehandelt.
Für alle nicht ausführlich behandelten Abschnitte und Ableitungen wird auf die entsprechende Fachliteratur (1,35,70,110,129) verwiesen.

3.8.1 Die Michaelis-Menten-Beziehung

3.8.1.1 Zeitlicher Ablauf enzymkatalysierter Reaktionen

Der einfachste Fall einer enzymkatalysierten Reaktion ist die Umwandlung eines Substrats S in ein Produkt P. Sie erfolgt am katalytischen Zentrum des Enzyms, wobei zwischenzeitlich ein Enzym-Substrat-Komplex ES als obligatorisches Zwischenprodukt auftritt:

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E + P$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit v wird als Differentialquotient der Abnahme der Substratkonzentration (S) bzw. der Zunahme der Produktkozentration (P) nach der Zeit definiert:

$$v = -\frac{d(S)}{dt} = \frac{d(P)}{dt} \qquad \text{(Gl. 1)}$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit v wird als Maß für die Aktivität eines Enzyms benutzt.

Die Veränderungen in den Konzentrationen der beteiligten Partner, die sich nach dem Mischen von Enzym und Substrat vollziehen, gibt Abb. 1 wieder.
Dazu wurde die Annahme gemacht, daß die Konzentration des Enzyms sehr klein gegenüber der des Substrats ist, sowie daß die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes rasch ist gegenüber der eigentlichen Umsatzgeschwindigkeit, d.h. dem Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes. Zudem soll dieser Zerfall irreversibel sein.
Mathematisch ausgedrückt soll also gelten:

$k_1 \sim k_2 \gg k_3$ und $k_4 = 0$

Der langsamste Schritt bestimmt die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion:

$$v = \frac{d(P)}{dt} = k_3 \, (ES) \qquad \text{(Gl. 2)}$$

Man unterscheidet in Abb. 1 deutlich drei Phasen der Reaktion. In einem sehr schnellen Prozeß (Millisekundenbereich), der Pre-Steady-State-Phase, baut sich der Enzym-Substrat-Komplex auf.

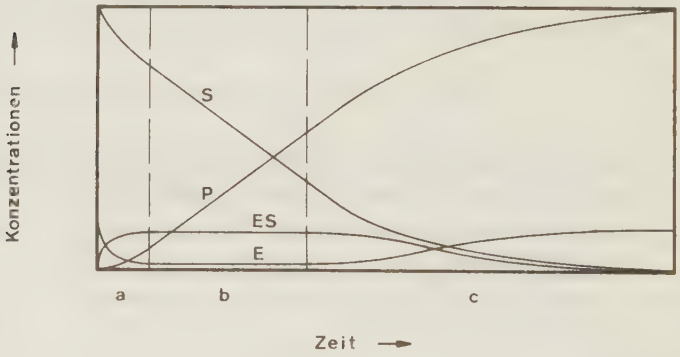


Abb. 1: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs einer enzymkatalysierten Reaktion unter Angabe der Konzentrationen der Reaktionspartner.
a) Pre-Steady-State-Phase (stark überzeichnet);
b) Steady-State-Phase;
c) Ausklingphase

Es schließt sich unmittelbar die Steady-State-Phase an. Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß hier das Substrat mit konstanter Geschwindigkeit abnimmt, das Produkt entsprechend zunimmt, während die Konzentrationen des Enzym-Substrat-Komplexes und des freien Enzyms praktisch unverändert bleiben.
In der Steady-State-Phase gilt also:

$$v = -\frac{d(S)}{dt} = \frac{d(P)}{dt} = \text{const.}; \quad \text{und:} \quad \frac{d(ES)}{dt} = 0$$

Die Zeitdauer dieser Phase hängt (außer von den Geschwindigkeitskonstanten) vom Verhältnis der Konzentrationen des Enzyms zu seinem Substrat ab. Bei möglichst geringen Enzym- und sehr hohen Substratkonzentrationen kann der konstante Substratumsatz über viele Minuten hinweg aufrecht erhalten werden.
In der nachfolgenden exponentiellen Phase wird das noch vorhandene Enzym bis zum Erreichen der Gleichgewichtslage der Gesamtreaktion abgebaut. Für den in der Abbildung angenommenen irreversiblen Prozeß bedeutet dies, daß das Substrat vollständig umgesetzt wird. Entsprechend fällt auch während dieser Ausklingphase die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes auf null.

Für normale enzymkinetische Untersuchungen stellt die Steady-State-Phase einen interessanten Bereich dar, da sich E und ES in ihren Konzentrationen nicht verändern und die anderen Reaktionspartner eine einfache lineare Zeitabhängigkeit aufweisen. Bei enzymkinetischen Messungen ist man daher bestrebt, diesen Bereich zu erfassen. Dies gelingt bei einem möglichst großen Verhältnis von Substrat zu Enzym. Da man im allgemeinen mit der Substratkonzentration von vorneherein festgelegt ist, sollte die eingesetzte Enyzmmenge so gering wie irgend möglich, d.h. experimentell noch vertretbar, gewählt werden. Weiterhin versucht man, die Reaktion von Anfang an, d.h. unmittelbar nach der Pre-Steady-

State-Phase zu erfassen, also sog. Anfangsreaktionen zu messen. An der Linearität der Zeit-Umsatz-Kurven läßt sich dann ablesen, ob und in welchem Maße es für eine bestimmte Reaktion gelungen ist, den Steady-State-Bereich zu erfassen.

3.8.1.2 Ableitung der Michaelis-Menten-Beziehung

Ein Spezialfall der Steady-State-Kinetik ist die Michaelis-Menten-Kinetik. Sie setzt die schon erwähnten Annahmen voraus, d.h. $k_1 \sim k_2 \gg k_3$ und $k_4 = 0$

Man erhält für (ES) aufgrund der Steady-State-Bedingung:

$$\frac{d(ES)}{dt} = 0 \qquad = \underbrace{k_1\,(E)(S)} \qquad \underbrace{-\,k_2\,(ES)} \qquad \underbrace{-k_3\,(ES)}$$

Geschwindigkeit für:	die Bildung von ES	den Zerfall von ES in E und S	den Zerfall von ES in E und P

$$k_1\,(E)(S) = (k_2 + k_3)\,(ES) \qquad \text{(Gl. 3)}$$

Die experimentell nicht bestimmbare Kozentration des freien Enzyms läßt sich mit Hilfe der Massenerhaltungsgleichung ersetzen:

$$(E_t) = (E) + (ES) \qquad \text{(Gl. 4)}$$

Gl. 4 in Gl. 3 eingesetzt ergibt:

$$(ES) = \frac{k_1\,(E_t)(S)}{k_2 + k_3 + k_1\,(S)} \qquad \text{(Gl. 5)}$$

Ersetzt man in Gl. 2 (ES) durch diesen Ausdruck und teilt Zähler und Nenner durch k_1, dann erhält man folgende Beziehung für die Reaktionsgeschwindigkeit v:

$$v = \frac{d(P)}{dt} = \frac{k_3\,(E_t)(S)}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + (S)} \qquad \text{(Gl. 6)}$$

Die drei Geschwindigkeitskonstanten im Nenner lassen sich zu einer Konstanten K_m, der Michaeliskonstanten zusammenfassen:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \qquad \text{(Gl. 7)}$$

Der Ausdruck $k_3 \cdot (E_t)$ in Gl. 6 repräsentiert die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V, die, nach Gl. 2, dann erreicht ist, wenn alle vorhandenen Enzymmoleküle gleichzeitig an der Reaktion teilnehmen:

$$V = k_3 \ (E_t) \qquad \text{(Gl. 8)}$$

Damit läßt sich Gl. 6 in vereinfachter Form schreiben:

$$v = \frac{V \ (S)}{K_m + (S)} \qquad \text{(Gl. 9)}$$

Diese Gleichung beschreibt die Abhängigkeit der Geschwindigkeit einer einfachen enzymkatalysierten Reaktion von der Konzentration des eingesetzten Substrats. Sie wurde zuerst von Michaelis und Menten (78) aufgestellt und wird daher als Michaelis-Menten-Beziehung bezeichnet.
Wenn man davon ausgeht, daß einem sehr raschen Aufbau eines stabilen Enzym-Substrat-Komplexes ein vergleichsweise langsamer Zerfall in Produkt und freies Enzym folgt, dann wird k_3 gegenüber k_1 und k_2 sehr klein und kann praktisch vernachlässigt werden. Unter dieser Bedingung ist die Michaeliskonstante K_m ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat; je kleiner der K_m-Wert, desto größer die Affinität.

Unter gegebenen experimentellen Bedingungen ist der K_m-Wert eine charakteristische Konstante für ein bestimmtes Enzym. Er hat die Dimension einer Konzentration und entspricht derjenigen Substratkonzentration, bei der die Enzymaktivität die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erreicht, d.h. $v = 1/2\ V$.

Die Michaeliskonstante ist von der Konzentration des Enzyms unabhängig, sie kann also ohne Kenntnis seines Molekulargewichts und, falls keine Störungen von außen einwirken, selbst in unreinen Präparationen und rohen Homogenaten bestimmt werden.
Eine zweite charakteristische Größe für Enzyme ist die Maximalgeschwindigkeit V. Sie ist jedoch, nach Gl. 8 der Menge des eingesetzten Enzyms direkt proportional, so daß eine Konstante nur bei bekannter Menge eines reinen Enzympräparates mit bekanntem Molekulargewicht angegeben werden kann.

3.8.1.3 Graphische Darstellung der Michaelis-Menten-Beziehung

Die Michaelis-Menten-Beziehung kann in einer v-(S)-Auftragung graphisch dargestellt werden (Abb. 2). Sie ergibt eine Hyperbel, deren Asymptote parallel

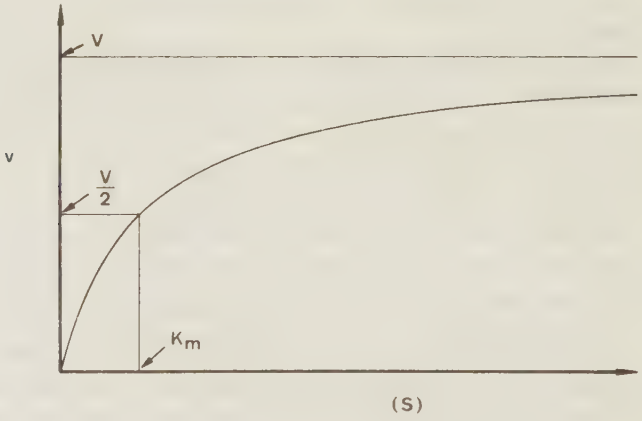


Abb. 2: v-(S)-Diagramm einer einfachen enzymkatalysierten Reaktion zur Bestimmung von V und K_m.

zur Abszisse V, und deren Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit K_m entspricht.

Wegen der Schwierigkeit der Asymptotenbildung bei einer experimentell zu bestimmenden Hyperbelkurve, wählt man im allgemeinen andere Verfahren zur Bestimmung von V und K_m.

Die Umkehrung der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{(S)} \qquad \text{(Gl. 10)}$$

führt zu einer Linearisierung bei Darstellung der Meßergebnisse in der doppelt reziproken Form 1/v gegen 1/(S). Sie wird als Lineweaver-Burk-Darstellung (73) bezeichnet. K_m und V erhält man, wie in Abb. 3 angegeben, aus den Schnittpunkten der Geraden mit der Abszisse bzw. Ordinate.

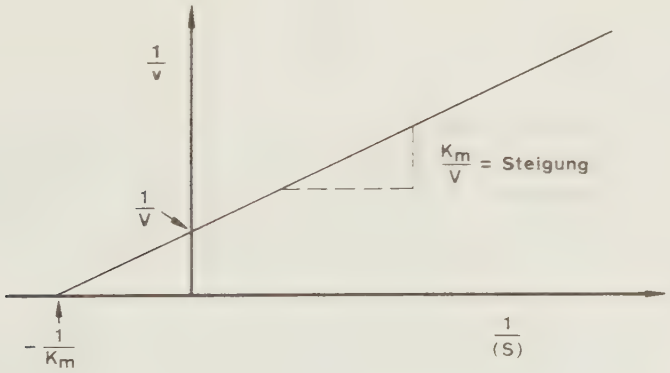


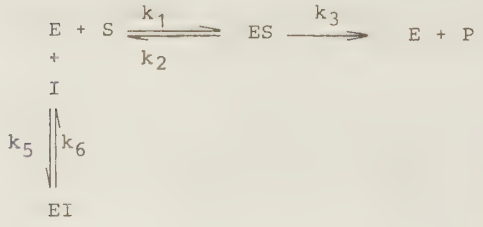
Abb. 3: Lineweaver-Burk-Diagramm einer einfachen enzymkatalysierten Reaktion zur Bestimmung von V und K_m.

3.8.2 Enzymhemmung

Eine Hemmung der enzymkatalysierten Reaktion tritt immer dann ein, wenn das aktive Zentrum des Enzyms beeinflußt wird. Dies kann sehr unspezifisch durch Veränderungen der Umgebung des Enzyms, wie der Temperatur, des pH-Werts, der Ionenstärke oder des Lösungsmittels ausgelöst werden. Für die Enzymkinetik sind jedoch solche hemmenden Einflüsse besonders interessant, die durch spezifisch an das Enzym bindende, physiologisch relevante Substanzen (Metaboliten) verursacht werden. Die Bindung dieser Hemmstoffe (oder Inhibitoren) ist immer reversibel.
In jedem Fall lassen sich solche Einflüsse auf die Enzymaktivität durch kinetische Messungen verfolgen und in einigen Fällen auch mathematisch einfach beschreiben.

3.8.2.1 Kompetitive Hemmung

Verbindungen, die mit dem Substrat um die Bindung am katalytischen Zentrum konkurrieren, selbst aber nicht umgesetzt werden, bezeichnet man als kompetitive Inhibitoren. Diese Substanzen müssen daher eine dem Substrat vergleichbare Affinität zum Enzym haben, sie sind diesem meist strukturell sehr ähnlich.
Der Reaktionsmechanismus läßt sich so beschreiben, daß ein Substrat S und ein Inhibitor I an das Enzym binden und sich in der Bindung gegenseitig ausschließen:



Die Dissoziationskonstante des Enyzm-Inhibitor-Komplexes, die Hemmkonstante, ist definiert als:

$$K_i = \frac{(E)(I)}{(EI)} \qquad \text{(Gl. 11)}$$

Die Ableitung der Geschwindigkeitsgleichung erfolgt im Prinzip wie für die einfache Michaelis-Menten-Beziehung. Nur erweitert sich die Massenerhaltungsgleichung um den für den katalytischen Prozeß nicht mehr verfügbaren Enzym-Inhibitor-Komplex:

$$(E_t) = (E) + (ES) + (EI) \qquad \text{(Gl. 12)}$$

Daraus ergibt sich für die Geschwindigkeitsgleichung:

$$v = \frac{V\,(S)}{K_m \left(1 + \frac{(I)}{K_i}\right) + (S)} \qquad \text{(Gl. 13)}$$

Die Reziprokgleichung für die graphische Darstellung nach Lineweaver und Burk lautet:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V}\left(1 + \frac{(I)}{K_i}\right)\frac{1}{(S)} \qquad \text{(Gl. 14)}$$

Sie ergibt eine Geradenschar (s. Abb.23, S. 76), die sich im Wert 1/V auf der Ordinate schneidet. Die Schnittpunkte mit der Abszisse ergeben nur scheinbare K_m- Werte, da sie von (I) abhängig sind. Der wahre K_m-Wert ist für (I) = 0 definiert.

Nach einem von Dixon (34) speziell für die Darstellung von Hemmkinetiken eingeführten Diagramm, variiert man den Inhibitor bei konstant gehaltenen Substratkonzentrationen und trägt 1/v gegen (I) auf:

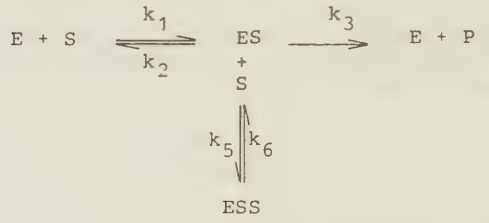
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V}\left(1 + \frac{K_m}{(S)}\right) + \frac{K_m}{V\,K_i\,(S)}\,(I) \qquad \text{(Gl. 15)}$$

Mathematisch läßt sich nachweisen, daß der gemeinsame Schnittpunkt der Geraden in dieser Auftragung die Koordinaten $-K_i$ und 1/V hat (s. Abb.24, S. 77).

3.8.2.2 Substrathemmung

Besonders bei höheren Konzentrationen beobachtet man manchmal bei Enzymen eine Hemmung durch ihr eigenes Substrat. Die Sättigungskurve (Abb. 2) strebt nicht einem Plateau zu, sondern fällt bei Substratüberschuß wieder ab. Besitzt das Enzym ein regulatorisches Zentrum, so läßt sich dieses Verhalten dadurch erklären, daß durch die Bindung von Substrat an dieses regulatorische Zentrum im Bereich des aktiven (katalytischen) Zentrums Konformationsänderungen auftreten, wodurch die Substratumsetzung gehemmt wird.

Das Rekationsschema lautet:



Die Bindungskonstante für das zweite (hemmende) Substratmolekül ist wie folgt definiert:

$$K_{ss} = \frac{(ES)(S)}{(ESS)} \qquad \text{(Gl. 16)}$$

Die Geschwindigkeitsgleichung lautet:

$$v = \frac{V\,(S)}{K_m + (S) + \frac{1}{K_{ss}}\,(S)^2} \qquad \text{(Gl. 17)}$$

Für die Reziprokform der Gleichung folgt:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V\,(S)} + \frac{1}{K_{ss}\,V}\,(S) \qquad \text{(Gl. 18)}$$

Im Lineweaver-Burk-Diagramm (s. Abb.15, S. 64) ist damit 1/v nicht mehr eine lineare Funktion von 1/(S), sondern die Kurve weicht, wie auch in der Dixon-

Darstellung, zur Ordinate hin nach oben ab.

Gl. 18 geht für niedrige Substratkonzentrationen ($(S) \longrightarrow 0$) in die Form über:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{(S)} \qquad \text{(Gl. 19)}$$

Und für hohe Substratkonzentrationen ($(S) \longrightarrow \infty$) gilt:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{1}{K_{ss}\ V} (S) \qquad \text{(Gl. 20)}$$

Man sieht, daß im Bereich niedriger Substratkonzentrationen die Michaelis-Menten-Gleichung durchaus angewendet werden kann. Analog gilt dasselbe für hohe Substratkonzentrationen zur Bestimmung von K_{ss}.
In der graphischen Darstellung bedeutet dies, daß sich K_m aus dem linearen Bereich der Kurve im Lineweaver-Burk-Diagramm (s. Abb 15, S. 64), K_{ss} entsprechend aus der Auftragung nach Dixon, durch Extrapolation auf die Abszisse gewinnen läßt.

3.8.3 Katalyse eines Substrats durch zwei Enzyme

Ergibt sich in der Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit im Lineweaver-Burk-Diagramm keine Gerade, sondern eine rechtskonvex gekrümmte Kurve, so bestehen, äußere Einflüsse ausgeschlossen, grundsätzlich zwei Erklärungsmöglichkeiten.
1. Die Reaktion wird durch ein allosterisches Enzym mit negativer Kooperativität katalysiert. Darunter versteht man ein Enzym, das zwei oder mehrere Bindungsstellen oder Untereinheiten besitzt. Wird durch die Anlagerung eines Liganden (z.B. Substrat) die Anlagerung eines weiteren Liganden erschwert, so spricht man von negativer Kooperativität.
2. Zwei verschiedene Enzyme katalysieren ein und dieselbe Reaktion.

Wenn zwei Enzyme ein Substrat gemeinsam umsetzen, so ergibt sich für die gesamte Reaktionsgeschwindigkeit v_t (für die Michaelis-Konstante des ersten Enzyms steht K_1, für die des zweiten K_2; analog dazu V_1 und V_2):

$$v_t = \frac{V_1\ (S)}{K_1 + (S)} + \frac{V_2\ (S)}{K_2 + (S)} \qquad \text{(Gl. 21)}$$

Die Reziprokform lautet:

$$\frac{1}{v_t} = \frac{1 + \frac{K_1 + K_2}{(S)} + \frac{K_1 K_2}{(S)^2}}{V_1 + V_2 + \frac{V_1 K_2 + V_2 K_1}{(S)}} \qquad \text{(Gl. 22)}$$

Nur für den Fall, daß $K_1 = K_2$, ergibt sich in der Lineweaver-Burk-Auftragung eine Gerade. Unterscheiden sich die beiden Konstanten, so erhält man eine rechtskonvex gekrümmte Kurve, die umso stärker abgewinkelt ist, je größer das Verhältnis von K_1 zu K_2 wird.

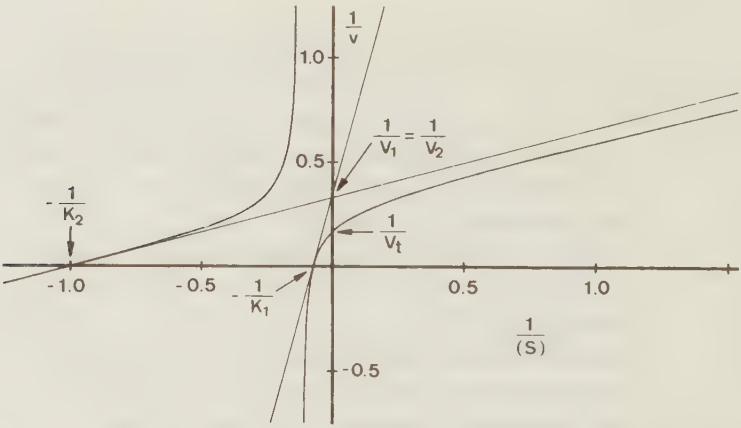


Abb. 4: Lineweaver-Burk-Diagramm einer Enzymreaktion, bei der zwei verschiedene Enzyme dasselbe Substrat katalysieren; theoretische Darstellung nach Gl. 22 mit $K_1 = 15$, $K_2 = 1$ und $V_1 = V_2 = 3$

In Abb. 4 ist eine theoretische Kurve nach Gl. 22 aufgetragen ($V_1 = V_2$; $K_2 : K_1 = 1 : 15$). Man erkennt zwei hyperbolische Kurven, die für negative 1/(S)-Werte im imaginären Bereich liegen. Für $1/v_t = 0$ erhält man aus Gl. 22 die Schnittpunkte mit der Abszisse, die $-1/K_1$ und $-1/K_2$ ergeben. Analog dazu errechnet sich der Ordinatenschnittpunkt für 1/(S) = 0 mit $1/(V_1 + V_2)$. Definiert man V_t als Maximalgeschwindigkeit der Gesamtreaktion, so gilt:

$$V_t = V_1 + V_2 \qquad \text{(Gl. 23)}$$

Die Tangenten durch die Abszissenschnittpunkte der Kurve sind identisch mit den Geraden, die sich aus der Lineweaver-Burk-Darstellung der Geschwindigkeitsgleichung der einzelnen Enzyme ergeben. Die Ordinate wird in $1/V_1$ bzw. $1/V_2$ geschnitten. Addiert man die Aktivitäts-Werte dieser Geraden und trägt sie in reziproker Form auf, so erhält man die dargestellten hyperbolischen Kurven.

Nicht nur das Verhältnis der beiden K_m-Werte macht sich im Krümmungsverhalten der Kurve bemerkbar, sondern auch der jeweilige Anteil der Enzyme an der Gesamtreaktion, d.h. das Verhältnis von V_1 zu V_2. In Abb. 5 werden bei konstanten K_m-Werten V_1 und V_2 variiert. Es ist deutlich zu sehen, daß bei Zunahme von V_2 die Kurve zwar stärker abgewinkelt wird, andererseits jedoch die Änderung der Steigung bei hohen 1/(S)-Werten sehr gering wird. Hier nähert sich die Kurve einer Geraden, deren Extrapolation die Abszisse in der Nähe von $-1/K_2$ schneidet (s. Abb.5, Kurve C). Dies entspricht der Erwartung, daß bei niedrigen Substratkonzentrationen hauptsächlich das Enzym mit kleiner Michaelis-Konstante am Substratumsatz beteiligt ist, da es wegen seiner höheren Affinität zum Substrat dieses nahezu allein für sich beansprucht.

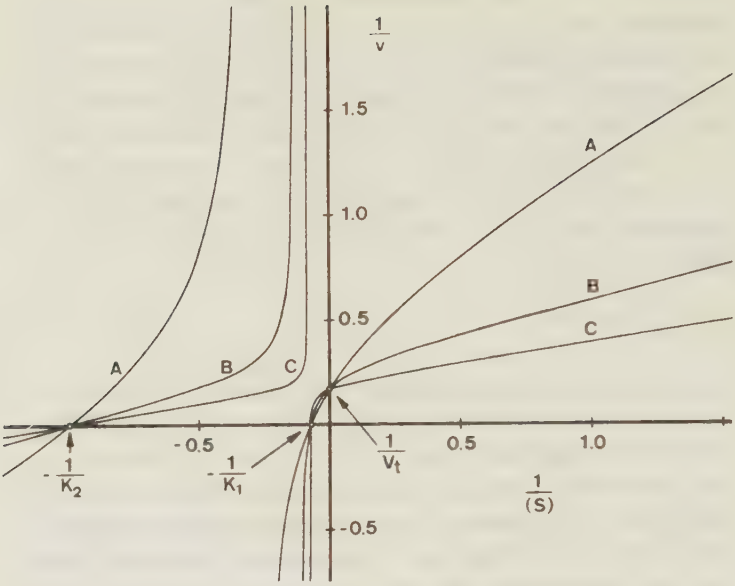


Abb. 5: Lineweaver-Burk-Diagramm von Enzymreaktionen bei der zwei Enzyme dasselbe Substrat katalysieren; theoretische Darstellung nach Gl. 22 mit gleichen Michaeliskonstanten (K_1 = 15, K_2 = 1) und verschiedenen Maximalgeschwindigkeiten: Kurve A (V_1 = 5, V_2 = 1); Kurve B (V_1 = V_2 = 3, identisch mit Abb. 4); Kurve C (V_1 = 1, V_2 = 5)

Insgesamt gesehen ist eine solche Kurve, bedingt durch die vier Variablen, sehr schwierig zu interpretieren. Trotzdem soll hier dargestellt werden, wie man aus verschiedenen Kurventypen Näherungswerte für die einzelnen Konstanten erhalten kann.

1. Bei einer Kurve, die bei hohen 1/(S)-Werten nahezu gerade und außerdem flach verläuft (Kurve C in Abb. 5), gilt die Bedingung: $K_1 > K_2$ und $V_2 > V_1$. Extrapoliert man den nahezu linearen Anteil der Kurve zur Abszisse, so bekommt man einen brauchbaren Näherungswert für K_2, der umso genauer ist, je stärker die oben genannte Bedingung ausgeprägt ist. In der Praxis kann dies bedeuten, daß die Krümmung sogar

übersehen wird. Gleichzeitig schneidet diese Extrapolationsgerade die Ordinate in $1/V_2$. Der Schnittpunkt der Kurve mit der 1/v-Achse $1/V_t$ läßt sich fast immer mit einiger Genauigkeit festlegen, so daß mit Gl. 23 V_1 errechnet werden kann. Damit sind drei Konstanten bekannt, und die vierte, K_1 kann man berechnen, indem man die bekannten Werte und ein Wertepaar eines beliebigen Punktes der Kurve in Gl. 22 einsetzt.

2. Bei allen übrigen Kurven, bei denen die Krümmung im (gesamten) Verlauf der Kurve deutlich sichtbar ist, (Kurve A und B in Abb. 5) geht man folgendermaßen vor: Die Kurve wird bei niedrigen 1/(S)-Werten in einer Krümmung auf die 1/(S)-Achse extrapoliert und bekommt so V_t und K_1. An diese Kurve wird im Abszissenschnittpunkt eine Tangente gelegt, welche die Ordinate in $1/V_1$ schneidet. Somit können mit Hilfe von Gl. 22 und Gl. 23 wieder die übrigen Werte ermittelt werden.

Die hier besprochenen Verfahren zur Erstellung von Näherungswerten können allerdings zu recht erheblichen Abweichungen von den tatsächlichen Werten führen, und sollten deshalb nur verwendet werden, um die Größenordnung der beteiligten Komponenten abzuschätzen. Nur mit einer statistischen Methode (114) erreicht man durch sukzessive Näherung recht genaue Werte.

4. ERGEBNISSE

4.1 Optimierung der Testbedingungen

Um die Testergebnisse mit Erfolg reproduzieren und vergleichen zu können, sind neben der Homogenisierung die Bedingungen bei der Aktivitätsbestimmung von entscheidender Bedeutung. Für enzymkinetische Messungen muß eine hohe Genauigkeit und der Einsatz möglichst kleiner Enzymmengen gefordert werden. Außerdem sollte das Verfahren durch eine relativ einfache Anwendbarkeit auch für Routineuntersuchungen geeignet sein.
Die gestellten Forderungen sind zum Teil unvereinbar; so erfordert z.B. eine hohe Genauigkeit meistens ein aufwendiges Verfahren. Die einzelnen Schritte sollten deshalb unter Abwägen der Auswirkungen so abgestimmt werden, daß alle Bedingungen in befriedigendem Maße erfüllt würden.

4.1.1 Aufbereitung der Gewebsproben

4.1.1.1 Einfluß der Zentrifugation

Obwohl theoretisch die Michaeliskonstante selbst in rohen Homogenaten (s. 3.8.1.2) bestimmt werden kann, war nach den ersten Vorversuchen klar, daß dies für diesen Fall nicht möglich war. Die Meßwerte wiesen eine so große Streubreite auf, daß sie für enzymkinetische Bestimmungen nicht verwertet werden konnten und höchstens für einfache Aktivitätsmessungen brauchbar waren. Zur graphischen Ermittlung von Enzymkonstanten werden recht genaue Werte benötigt, um bei ihrer Auftragung eindeutige Ergebnisse zu erhalten.

Aufgrund der ersten Resultate wurde das rohe Homogenat zunächst bei etwa 3200 g zentrifugiert. Mit dem Überstand aus diesen Proben konnten schon brauchbare Ergebnisse erzielt werden. Diese wurden noch verbessert, indem die Zentrifugation auf 10.000 g erhöht wurde. Dabei konnte im Überstand eine fetthaltige obere Phase abgetrennt werden. Der gewonnene klare Überstand enthielt ca. 70 % der Aktivität an α-Glucosidase des ursprünglichen Homogenats. Gegenüber diesem erhöhte sich die spezifische Aktivität (auf Protein bezogen) um das 1,5fache.

4.1.1.2 Zugabe von Merkaptoäthanol

Um eventuell vorhandene Disulfidbindungen im Enzym zu schützen, wurde der Versuch unternommen, die Gewebsproben mit 1 mM Meraptoäthanol, wie unter 3.3 angegeben, zu verdünnen. Die gemessene Enzymaktivität wurde mit einer Probe desselben Gewebes verglichen, die nur mit Aqua dest. homogenisiert worden war. Die Messungen wurden mit Maltose 20 mM bei pH-Werten zwischen 3,0 und 7,5 durchgeführt.
Zwischen den beiden Proben konnte keinerlei Unterschied hinsichtlich der Aktivitätsverteilung festgestellt werden. Deshalb wurde bei der Herstellung der Organ- und Zellproben nur Aqua dest. als Lösungsmittel benutzt.

4.1.1.3 Zellaufschlußverfahren

Zellen und vor allem Zellorganellen (Lysosomen) können sowohl durch Ultraschall, als auch durch mehrmaliges Gefrieren und Auftauen zerstört und dadurch die Enzyme in Lösung gebracht werden. Um die größte Aktivitätsausbeute zu erhalten, wurden beide Verfahren getestet.

Dazu werden drei Proben eines frisch hergestellten Homogenats verschieden behandelt: Probe A wurde einmal gefroren (-20°C) und wieder aufgetaut; bei B wurde dieser Vorgang sechsmal vorgenommen; die dritte Probe C wurde nur beschallt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und die Aktivität in den Überständen gemessen: Zwischen den Aktivitätswerten der Proben A, B und C wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.
Wegen der kürzeren und sicheren Anwendung wurde als Lysosomenaufschluß die Behandlung mit Ultraschall gewählt. Außerdem wird die Aktivität der neutralen α-Glucosidase nicht beeinträchtigt (19).

4.1.2 Enzymtest

4.1.2.1 Puffer

Als geeigneter Puffer zur Bestimmung des pH-Optimums der α-Glucosidase bot sich besonders der Citrat-Phosphatpuffer nach McIlvaine (75) an, da er über einen sehr weiten pH-Bereich eingesezt werden kann. Um zu überprüfen, ob die Pufferkapazität auch bei den Extremwerten noch ausreicht, wurde der pH-Wert im Reaktionsgemisch mittels pH-Meter gemessen. Dabei zeigte sich, daß von pH 2,5 bis 8,5 die Werte ausreichend konstant blieben; an den Endpunkten ergaben sich Abweichungen von maximal 0,1.
Substratlösungen mit McIlvaine-Puffer waren des öfteren mit Pilzen kontaminiert und dadurch unbrauchbar geworden. Aus diesem Grund wurde für alle enzymkinetischen Messungen ein Natriumacetatpuffer genommen, der sich als sehr viel weniger anfällig erwies. Sein Pufferbereich reichte von pH 3,5 bis 7,0 und wurde ebenfalls überprüft.
Um festzustellen, ob beide Puffer (0,1 M) nebenein-

ander verwendet werden konnten, wurde bei beiden mit derselben Probe (Leber fötal) eine Aktivitätsmessung über den gesamten Pufferbereich durchgeführt. Es wurden übereinstimmende pH-Kurven ermittelt; andere Arbeiten (44,61) bestätigen dieses Ergebnis.

4.1.2.2 Reaktionsstopp

Da die verwendeten Organproben nur geringfügig angereichert waren, d.h. noch viel Fremdprotein entielten, wurde die Enzymreaktion mit Perchlorsäure beendet. Damit ist eine sehr gute Proteinfällung gewährleistet, so daß beim anschließenden Glucosetest die Grundextinktion sehr niedrig lag. Der sonst in der Literatur häufig erwähnte Tris-HCl-Puffer (pH 8,0), sollte dagegen nur bei proteinarmen Proben benützt werden (80).

Wie unter 3.7.1.3 bereits angeführt, konnte für die Aktivitätsbestimmungen mit Glykogen als Substrat der Reaktionsstopp nicht mit PCA durchgeführt werden, weil durch sie Glykogen teilweise gespalten wird und somit falsch hohe Werte entstehen. Die deshalb angewandte Erwärmung auf 95°C für drei Minuten ergibt ebenfalls eine sichere Denaturierung, jedoch liegt die Grundextinktion beim Glucosetest etwas höher, als wenn PCA Anwendung findet.

4.1.2.3 Verwendung von Halbmikroküvetten

Für Aktivitätsbestimmungen - zur Sicherung einer klinischen Diagnose - aus Leber- oder Muskelbiopsien steht im allgemeinen zur sehr wenig Material (einige mg) zur Verfügung. Um mit diesen geringen Mengen auszukommen, war in unserem Labor eine Methode unter Anwendung von Mikroküvetten entwickelt worden.
Leider erhöht sich dabei nicht die Empfindlichkeit

des Verfahrens, es wird im Gegenteil ungenauer. Abgesehen von der schwierigen Handhabung, sind hauptsächlich zwei Gründe ausschlaggebend. Zum einen wirken sich bei geringen Volumina Pipettierfehler stärker auf den Gesamtfehler aus und zum anderen muß wegen der Mikroküvetten der Lichtstrahl des Photometers stark abgeblendet werden (Schlitz 1 x 4 mm), so daß dieser auf die höchste Verstärkung geschaltet werden muß. Dadurch zeigen sich schon bei geschlossenem Lichtweg erhöhte Schwankungen um einen Mittelwert (Rauschen), die das Ablesen vor allem von Doppelwerten erschweren. Außerdem verursachen schon geringste Verunreinigungen eine beträchtliche Extinktionserhöhung.
Diese Nachteile wurden vermieden, indem Halbmikroküvetten aus optischem Spezialglas verwendet wurden. Der Lichtstrahl muß dabei nur auf 2,5 x 12 mm abgeblendet werden, d.h. gegenüber der Mikromethode erreicht die Photozelle eine 7,5fach höhere Lichtmenge; der Photometer bietet ein optisch ruhiges Bild.
Die eingesetzten Volumina verdoppelten sich gegenüber der früheren Methode, was aber durch eine höhere Testempfindlichkeit ausgeglichen wurde, so daß die ursprünglich benötigte Probenmenge nicht erhöht werden mußte.

Für enzymkinetische Messungen sind unbedingt Küvetten aus optischem Spezialglas oder Quarz erforderlich. Sie haben gegenüber den sonst üblichen Kunststoffküvetten zum Einmalgebrauch den Vorteil einer höheren spektralen Durchlässigkeit, vor allem im Bereich der verwendeten niedrigen Wellenlänge. Zudem erreicht man nur mit Präzisionsküvetten die für Doppelwerte notwendige identische Lichtdurchlässigkeit.

Insgesamt ergaben sich aus der verbesserten Organaufbereitung, der Säuredenaturierung und der Verwendung von Halbmikroküvetten bei der Messung der Probenwerte im allgemeinen keine größeren Extinktionsunterschiede als 0,002 für die Doppelwerte.

4.1.2.4 Erstellung geeigneter Leerwerte

Um die schon vor der Enzymreaktion vorhandene Glucose messen und von der im Probenwert gemessenen Gesamtmenge abziehen zu können, mußten geeignete Leerwertsbestimmungen gefunden werden. Sie sollten auch eventuelle Veränderungen innerhalb des Homogenats bzw. des Substrats erfassen, die nicht auf reine Enzym-Substrat-Reaktionen zurückzuführen sind.
Dazu wurden eine normale Probe und zwei verschieden ausgeführte Leerwerte zur Aktivitätsbestimmung angesetzt:

1. Ansatz einer Probe:
   30 µl Substratlösung (56 mM Maltose in Acetatpuffer, pH 4,0),
   30 µl Na-Acetatpuffer (0,1 M, pH 4,0),
   20 µl Homogenat (Leber, fötal; Verdünnung 1 : 5) ergaben
   80 µl Reaktionsgemisch, das eine Stunde bei 37°C inkubiert wurde; danach Reaktionsstopp mit
   200 µl PCA (ca. 0,3 N) und
   30 µl Na-Acetatpuffer (pH 4,0) ergaben
   310 µl Gesamtvolumen A

2. Beim Leerwert$_1$ wurde die Substratlösung durch Puffer ersetzt; es sollte keine normale Reaktion stattfinden, und so eventuelle Veränderungen innerhalb des Homogenats herausgefunden werden:
   60 µl Na-Acetatpuffer und
   20 µl Homogenat ergaben
   80 µl Homogenatlösung derselben Konzentration wie unter 1. Diese wurde eine bzw. zwei Stunden bei 37°C inkubiert; danach mit
   200 µl PCA gestoppt; mit
   30 µl Substratlösung wurde dasselbe Gesamtvolumen erreicht:
   310 µl Gesamtvolumen B (1 Stunde inkubiert) und C (2 Stunden inkubiert).

3. Beim Leerwert$_2$ wurde das Homogenat sofort denaturiert, so daß keine Enzymreaktion mehr erfolgen konnte.
   200 µl PCA,
   20 µl Homogenat,
   30 µl Substratösung,
   60 µl Na-Acetatpuffer ergaben wieder
   310 µl Gesamtvolumen; D wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert, E stand eine Stunde bei Raumtemperatur und F wurde nach dem Ansatz sofort weiterverwendet.

Nach der Denaturierung bzw. Inkubation wurden von sämtlichen sechs Proben 40 µl in 500 µl Triäthanolaminpuffer (Glucosetest) gegeben und die Grundextinktion gegen Luft gemessen (Dreifachwerte). Sie lag bei sämtlichen Proben bei 0,070 (+ 0,001). Anschließend wurden die restlichen Reagentien dazupipettiert und die Reaktion begonnen. Nach 15 - 20 Minuten wurde die Extinktion erneut gegen Luft bestimmt: Probe A wies einen Wert von 0,245 auf, die Proben B - F einen einheitlichen Extinktionswert von 0.170 ($\pm$ 0,001).
Damit konnte bewiesen werden, daß keine Glucose aufgrund einer unerwünschten, nicht kontrollierten Reaktion entsteht.
Die höhere Extinktion des Leerwerts gegenüber der Grundextinktion beruht zum Teil auf dem Glucosegehalt der Maltose; er wird vom Hersteller mit 0,1 % angegeben.

Für die Aktivitätsbestimmungen wurde die einfachste Methode gewählt, d.h. die sofortige Denaturierung ohne Inkubation (entspricht E oder F).

4.1.2.5 Inkubationszeit und Proteinkonzentration des Reaktionsgemisches

Unter 3.8.1.1 wurde dargelegt, daß die Michaelis-Menten-Beziehung nur im Bereich des Steady-State gültig ist, d.h. der Substratumsatz muß eine einfache lineare Zeitabhängigkeit aufweisen. Da bei enzymkinetischen Messungen die Substratkonzentration möglichst konstant bleiben soll, versucht man die verbleibenden Variablen Enzymmenge und Reaktionszeit so niedrig wie möglich zu halten.
Bei den Bestimmungen sollte die Anfangsgeschwindigkeit gemessen werden, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit, bei der die eingesetzte Substratkonzentration noch nicht spürbar abgefallen ist. Üblicherweise erreicht man dies, indem man die Reaktion durch Direktschreibung (Zeit gegen Extinktion) verfolgt und aus der Anfangssteigung die Geschwindigkeit ermittelt. Die in dieser Arbeit beschriebene Methode läßt dies jedoch nicht zu, da es sich um einen indirekten Test handelt, d.h. eine laufende Registrierung ist nicht möglich.
Das bedeutet für die praktische Durchführung, daß nur solche Meßergebnisse verwertbar sind, die innerhalb einer linearen Zeit-Umsatz-Kurve liegen.
Um dies für die eigenen Untersuchungen feststellen zu können, wurde der folgende Versuch durchgeführt, bei dem Proben (Leber fötal) mit Proteinkonzentrationen von 0,1 - 4,1 mg/ml 60, 120 und 240 Minuten lang inkubiert wurden; die Maltosekonzentration betrug 5 mM.

Abb. 6 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen. Die Extinktionsänderung ΔE - sie ist direkt proportional dem Substratumsatz - ist gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Die drei Kurven ergeben sich aus den verschiedenen Inkubationszeiten. Man sieht, daß die Umsatz-Protein-Beziehung für die Rekationszeit von einer Stunde über den ganzen Bereich linear verläuft, für zwei Stunden bis etwa 2 mg/ml und für vier

Stunden nur bis 1 mg/ml (s. Pfeile).
Die Linearität der Zeit-Umsatz-Kurve läßt sich aus dem Verhältnis der Steigungen ablesen. Bei einer bestimmten Proteinkonzentration (Enzymmenge) muß bei

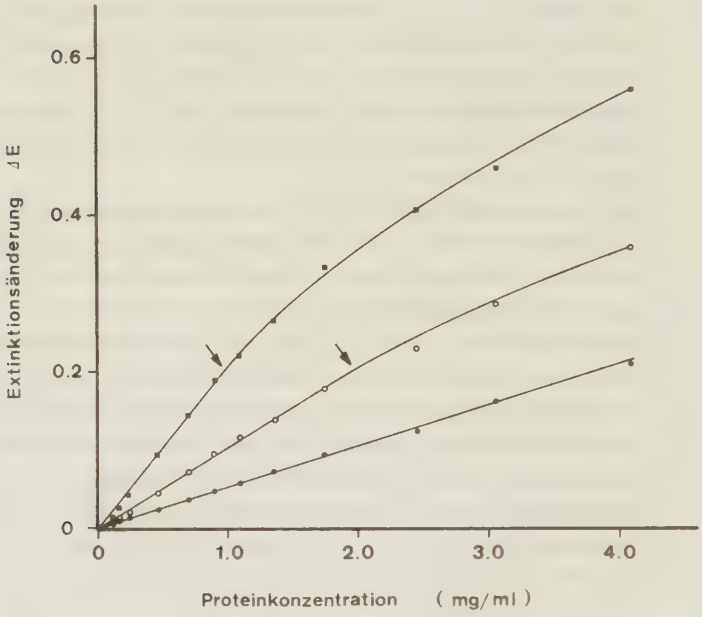


Abb. 6: Darstellung des Substratumsatzes bei verschiedenen Proteinkonzentrationen im Reaktionsgemisch und unterschiedlichen Reaktionszeiten:
(●) 60 Min. Inkubationszeit; (○) 120 Min.; (■) 240 Min.

einer linearen Beziehung der Substratumsatz (ΔE) nach zwei Stunden doppelt bzw. nach vier Stunden viermal so groß sein wie nach einer Stunde, was bis ΔE = 0,2 gegeben ist. Durch einen darüber hinaus gehenden Umsatz sinkt die Substratkonzentration so stark ab, daß - nach der Michaelis-Menten-Beziehung - die Aktivität spürbar abnimmt. So war bei den höchsten Extinktionswerten die Substratkonzentration um nahezu 20 % gefallen.

Als Konsequenz für die Versuche ergab sich, daß die Inkubationszeit möglichst nicht länger als 60 Minuten dauern und die Proteinkonzentration 2 mg/ml nicht überschreiten sollte.
Die angegebenen Richtwerte besitzen ihre absolute Gültigkeit nur bei der eingesetzten Maltosekonzentration von 5 mM. Da sich nach der Michaelis-Menten-Beziehung bei höheren Substratkonzentrationen ein Abfall weniger stark auf die Reaktionsgeschwindigkeit auswirkt, verschieben sich dort die Grenzen zu höheren Werten; für niedrigere Konzentrationen gilt das Gegenteil.
Zur Bestimmung der Michaeliskonstante wurden Inkubationszeit und Proteinkonzentration so abgestimmt, daß bei 20 mM Maltose ein Substratabfall von 0,5 - 1 % und bei 2 mM von 1 - 3 % nicht überschritten wurde.
Bei der graphischen Ermittlung von K_m haben Abweichungen dieser Größenordnung noch keine erkennbaren Auswirkungen.

4.1.2.6 Einfluß von Ionen

Die Aktivität eines Enzyms ist häufig von der Ionenstärke seiner Umgebung abhängig. Um den Einfluß von Kationen auf die katalytische Tätigkeit der α-Glucosidase zu erfahren, wurden dem Reaktionsgemisch mit Leberhomogenat (fötal) und Maltose (20 mM) NaCl, KCl und MgCl in Konzentrationen von 5 und 25 mM zugesetzt. Die Aktivität erhöhte sich jeweils leicht und lag bei 25 mM Salzkonzentration um 5 - 7 % über dem Ausgangswert.
Wegen des geringen Effekts, den auch Palmer (90) schon beobachtet hatte, wurde auf eine gesonderte Zugabe von Chloridsalzen beim Enzymtest verzichtet.

4.1.2.7 Einfluß von Albumin

Koster und Slee (68) berichten, daß Albumin nicht nur einen stabilisierenden Effekt auf die α-Glucosidase ausübt, sondern eine echte Aktivierung stattfindet, die mit Maltose als Substrat die Aktivität um 50 % steigern soll.

Diese für eine Testoptimierung wichtige Feststellung wurde in einem Versuch mit einem Leberhomogenat (Erwachsener) untersucht. Unter den beschriebenen Testbedingungen wurden Maltosekonzentrationen von 2 bis 100 mM eingesetzt, die Proteinkonzentration im Reaktionsgemisch betrug, bedingt durch das Homogenat, 0,15 mg/ml.

In einer zweiten Testreihe enthielt das Reaktionsgemisch zusätzlich 0,25 mg/ml Humanalbumin.

Für die Aktivitätswerte bei gleichen Substratkonzentrationen ergab sich zwischen den beiden Testreihen kein signifikanter Unterschied.

Daraus ist zu folgern, daß es sich bei dem beschriebenen Verhalten um einen unspezifischen Proteineffekt handelt, der das Enzym lediglich stabilisiert. Aktivitätssteigerungen sind nur bei reinen Enzympräparationen zu erwarten, wo die Proteinkonzentration vom physiologischen Milieu stark abweicht. Eine besondere Zugabe von Albumin ist demnach bei Proteinkonzentrationen über 0,1 mg/ml nicht nötig.

4.2 pH-Abhängigkeit der α-Glucosidase

Enzyme zeigen aufgrund ihrer Elektrolytnatur meist eine ausgeprägte Abhängigkeit ihrer katalytischen Aktivität vom pH-Wert der sie umgebenden Lösung. Der Bereich, innerhalb dessen das Enzym seine maximale Aktivität entfaltet, ist ein spezifisches Merkmal eines Enzyms. Trägt man die Enzymaktivität gegen verschiedene pH-Werte graphisch auf, so erhält man eine charakteristische Kurve mit einem mehr oder weniger scharfen Maximum, welches als das pH-Optimum der entsprechenden Enzymreaktion bezeichnet wird. Enzyme ähnlicher Wirkung lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen pH-Optima unterscheiden. Diese hängen allerdings bis zu einem gewissen Grad vom Milieu (Art des Puffers, Konzentrationen, Effektoren usw.) ab, in welchem die Reaktion abläuft.
Zur Bestimmung des pH-Optimums der α-Glucosidase wurden die verschiedenen Organ- und Zellproben im Reaktionsgemisch pH-Werten von 2,5 bis 8,5 ausgesetzt. Als Puffer diente ein 0,1 M Citrat-Phosphatpuffer, als Substrat Maltose 20 mM.

4.2.1 Leber

Der Einfluß des pH auf die Aktivität der α-Glucosidase von der Leber eines Erwachsenen (40 Jahre, männl.) ist in Abb. 7 dargestellt. Man sieht eine asymmetrische Glockenkurve mit einem scharfen Maximum bei pH 4,0. Das pH-Optimum im unphysiologischen sauren Bereich ist kennzeichnend für hydrolysierende Enzyme und als Hinweis für die lysosomale Herkunft der α-Glucosidase zu werten. Ob der flache Verlauf der Kurve im neutralen Bereich auf die zusätzliche Aktivität einer sogenannten neutralen α-Glucosidase zurückzuführen ist, kann aufgrund der einfachen Aktivitätsmessungen nicht festgestellt werden.

Hers (51) hatte bei seinen Versuchen mit der Leber eines Kindes eine pH-Abhängigkeit erhalten, die mit der hier dargestellten nahezu völlig übereinstimmt. Er hatte die Vermutung ausgesprochen, daß menschliche Leber kein neutrales Enzym enthält; jedenfalls nicht in dem Ausmaß, wie dies bei der Leber von Ratten der Fall ist (71). Allerdings sind bei Proben von menschlichen Organen

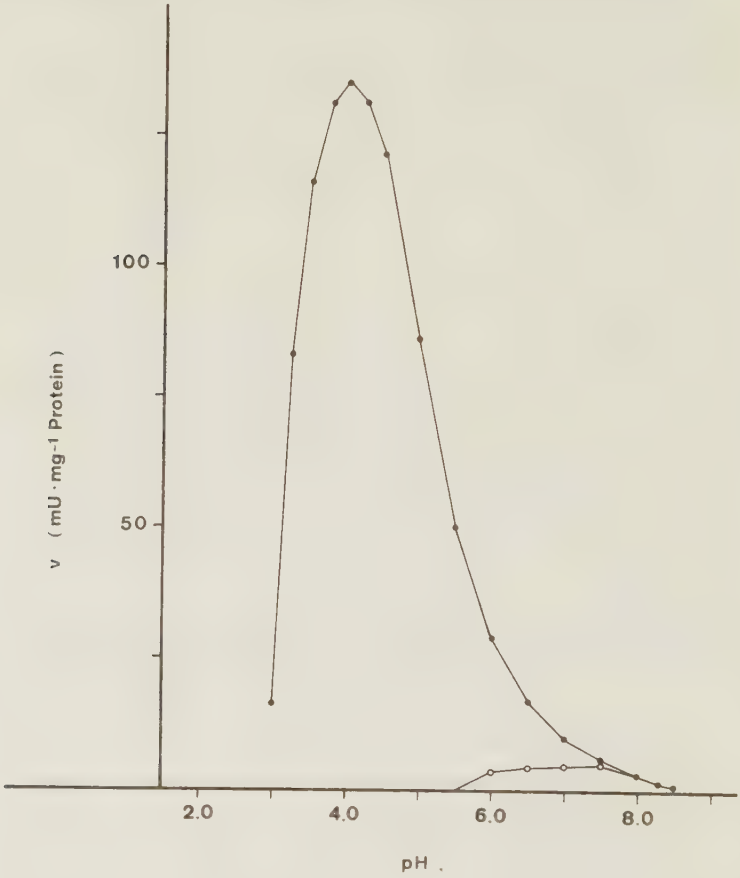


Abb. 7: pH-Abhängigkeit der α-Glucosidase aus der Leber eines Erwachsenen (40 J., männl.) mit Maltose 20 mM als Substrat: (●) Gesamtaktivität und (o) Anteil an neutraler α-Glucosidase

im allgemeinen nicht die guten Versuchsbedingungen gegeben wie bei Ratten. Ein längerer Zeitraum bis zur Verwendung und vorheriges Gefrieren könnten die neutrale α-Glucosidase (zum Teil) inaktivieren; eine größere Thermolabilität ist bekannt.
Das in Abb. 7 dargestellte Ergebnis stimmt auch mit den meisten anderen Beobachtungen von Versuchen mit menschlicher Leber überein, die aus der Literatur bekannt sind (68,80,103,118). Ebenso zeigen die Aktivitätskurven mit Humanplazenta (28,99) den gleichen Verlauf mit einem Maximum bei pH 4,0. Lediglich Gamklou und Scherstén (48, 49) geben für die Leber von Erwachsenen ein pH-Optimum von 4,6 - 5,1 an.
Eine Aktivität-pH-Wert-Darstellung mit einem reinen Enzympräparat von saurer α-Glucosidase ist in Abb. 8 zu sehen; das Maximum liegt bei pH 4,1. Der Maßstab wurde so gewählt, daß der maximale Aktivitätswert in derselben Höhe wie das Maximum in Abb. 7 aufgetragen wurde. Projiziert man beide Abbildungen übereinander, so erhält man nahezu deckungsgleiche Kurven, die erst ab pH 5,5 voneinander abweichen. Die Aktivitätskurve mit dem reinen Enzym erreicht die Nullinie bereits bei pH 7,5, für das ungereinigte Erwachsenenenzym ist dies erst bei pH 8,5 der Fall.
In Abb. 7 ist die Differenz zwischen den beiden Kurven dargestellt. Da man davon ausgehen kann, daß in der reinen Enzympräparation keine neutrale α-Glucosidase enthalten ist, so kann die zusätzliche Aktivität nicht von dem lysosomalen Enzym stammen. Aus der Verteilung im neutralen Bereich kann man den Schluß ziehen, daß auch in der menschlichen Leber eine neutrale α-Glucosidase vorkommt, deren Anteil an der Gesamtaktivität im Vergleich zum sauren Enzym recht gering ist. Eine neutrale α-Glucosidase in Menschenleber mit ähnlicher Aktivitätsverteilung fanden auch Brown und Brown (13), wobei sie die Enzyme durch differentielle Zentrifugation (subzelluläre Fraktionierung) getrennt hatten.

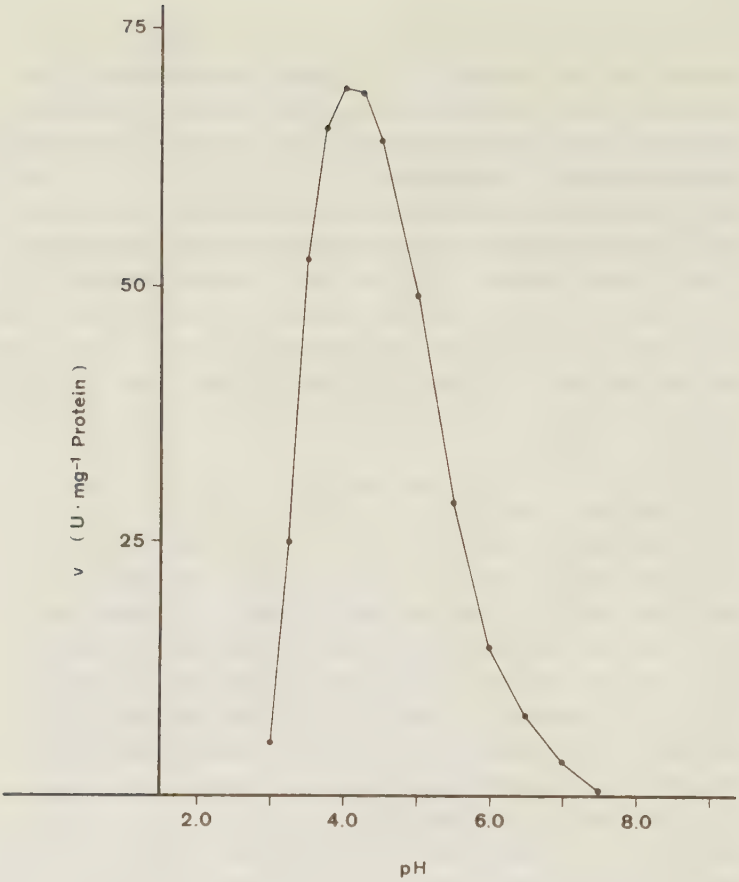


Abb. 8: pH-Abhängigkeit einer reinen sauren α-Glucosidase aus Humanleber mit Maltose 20 mM als Substrat

Die in Abb. 9 gezeigte pH-Kurve der α-Glucosidase von der Leber eines Föten (14. SSW, männl.) erreicht im Vergleich zur Erwachsenenleber eine erheblich geringere Aktivität. Ansonsten ist die Aktivitätsverteilung im wesentlichen gleich der in Abb. 7: ein relativ scharfes pH-Optimum bei pH 4,0 und ein flacher Verlauf der Kurve im neutralen Bereich. Daraus läßt sich mit einiger Wahrscheinlichkeit folgern, daß die sauren α-Glucosidasen

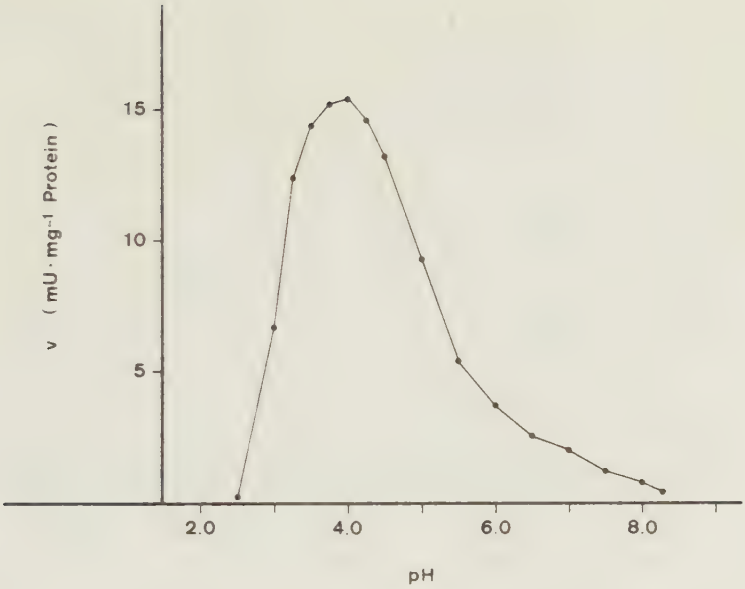


Abb. 9: pH-Abhängigkeit der α-Glucosidase aus der Leber eines Föten (14. SSW, männl.) mit Maltose 20 mM als Substrat

von Föten und Erwachsenen identisch sind, bei letzteren ist lediglich mehr Enzym enthalten.

4.2.2 Niere

Bei der pH-Abhängigkeit der α-Glucosidase von der Niere eines Erwachsenen (40 J., männl.) (Abb. 10) fällt auf, daß hier im Gegensatz zum Leberenzym kein scharfes pH-Optimum im sauren Bereich vorkommt. Dagegen weist die Niere in einem weiten Bereich von etwa pH 4,0 bis 7,5 eine hohe Aktivität auf, deren höchster Wert zwischen pH 6,0 und 6,5 liegt. Diese Verteilung - mit einer kleinen Senke bei pH 5,5 - legt den Schluß nahe, daß es sich hierbei um die Summenkurve der Aktivitäten von mindestens zwei Enzymen handelt, von denen

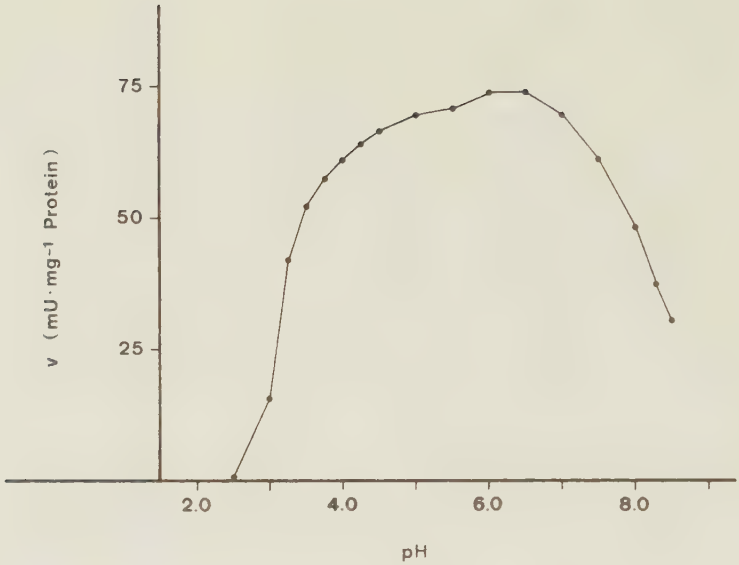


Abb. 10: pH-Abhängigkeit der α-Glucosidase aus der Niere eines Erwachsenen (40 J., männl.) mit Maltose 20 mM als Substrat

das Enzym mit der Hauptaktivität im neutralen Bereich den größten Anteil an der Gesamtaktivität stellt.

Die pH-Kurven mit menschlicher Niere die Steinitz et al. (118) und Salafsky et al. (102) veröffentlichten, lassen eine ähnliche Aktivitätsverteilung erkennen.

1972 hatten Dreyfus et al. (36) durch elektrophoretische Untersuchungen gefunden, daß in der Niere neben der sauren und der neutralen α - Glucosidase ein drittes Isoenzym vorhanden sein muß, das sowohl bei pH 4,0 als auch bei pH 6,5 aktiv ist. Diese Feststellung wird durch eine russische Arbeit (125) unterstützt, wo nach einer säulenchromatographischen Isolierung des neutralen Enzyms vier Isoenzyme elektrophoretisch nachgewiesen wurden. Sie besitzen pH-Optima zwischen pH 6,0 und

6,6 und zeigen beinahe identische katalytische Eigenschaften. Addiert man die pH-Kurven dieser Isoenzyme mit der des sauren Enzyms, so erhält man in etwa eine Summenkurve wie in Abb. 10. Der Anteil der sauren α-Glucosidase an der Gesamtaktivität wird mit 10 % angegeben.
Auch de Burlet et al. (30) isolierten das neutrale Enzym aus menschlicher Niere, dessen pH-Kurve (31) einen sehr ähnlichen Verlauf wie Abb. 10 zeigt; nur im sauren Bereich bis etwa pH 5,0 ist die Aktivität relativ geringer. Bei pH 4,0 beträgt sie immerhin noch 75 % des Maximums, das bei pH 6,0 liegt.
Wegen des unterschiedlichen immunologischen Verhaltens wird das Enzym der Niere mit dem breiten Aktivitätsbereich von Dreyfus et al. (37) als "renale" Maltase bezeichnet, die auch in ihren sonstigen Eigenschaften von der sauren und der neutralen α-Glucosidase abweicht. Dieselben Autoren fanden auch in der Niere einen ge-

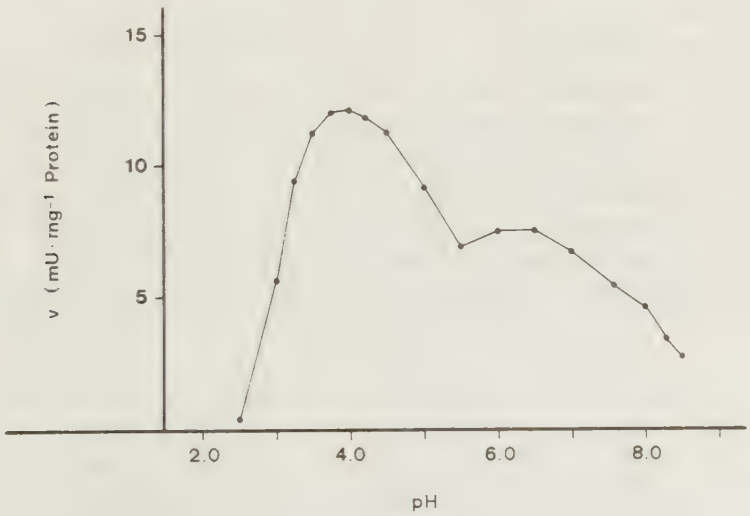


Abb. 11: pH-Abhängigkeit der α-Glucosidase aus der Niere eines Fötus (14. SSW, männl.) mit Maltose 20 mM als Substrat

ringen Anteil der zytoplasmatischen neutralen α-Glucosidase.
Das Ergebnis der Versuche mit der Niere eines Föten (14. SSW, männl.) ist in Abb. 11 dargestellt. Überraschenderweise weicht das Aktivitätsmuster deutlich von dem mit der Erwachsenenniere ab. Nach einem ersten Aktivitätsgipfel im sauren Bereich bei pH 4,0 folgt ein zweiter kleinerer, dessen größte Aktivität - zwischen pH 6,0 und 6,5 - ca. 60 % des Maximums bei pH 4,0 beträgt. Gegenüber der Erwachsenenniere ist der relative Anteil an neutraler α-Glucosidase hier wesentlich geringer. Wenn man davon ausgeht, daß der Anteil des sauren Enzyms beim Erwachsenen ca. 10 % der Gesamtaktivität ausmacht (125), so kann man folgern, daß beim Föten im Laufe der weiteren Entwicklung die spezifische Aktivität der sauren α-Glucosidase in etwa gleich bleibt, während die der renalen α-Glucosidase noch um ein Vielfaches ansteigt.

4.2.3 Leukozyten

Die pH-Kurve von den aus dem venösen Vollblut eines Erwachsenen (28 J., männl.) gewonnenen Leukozyten (Abb. 12) läßt, abgesehen von der viel niedrigeren Aktivität, Ähnlichkeit mit der adulten Niere erkennen: ein breites pH-Optimum mit einem Maximum bei pH 6,5 und eine leichte Absenkung bei pH 5,5.
Einen zweigipfligen Verlauf mit einer höheren Aktivität im neutralen Bereich, der auf das Vorkommen von mindestens zwei Enzymen schließen läßt, haben auch andere Autoren (5,66,87) beschrieben. Die größte Ähnlichkeit mit der dargestellten Kurve weist die Veröffentlichung von Dreyfus et al. (37) auf. Sie entdeckten, daß der zweite Gipfel bei pH 6,5 auf die Aktivität eines Enzyms zurückzuführen ist, das dieselben immunologischen Eigenschaften aufweist wie die renale α-Glu-

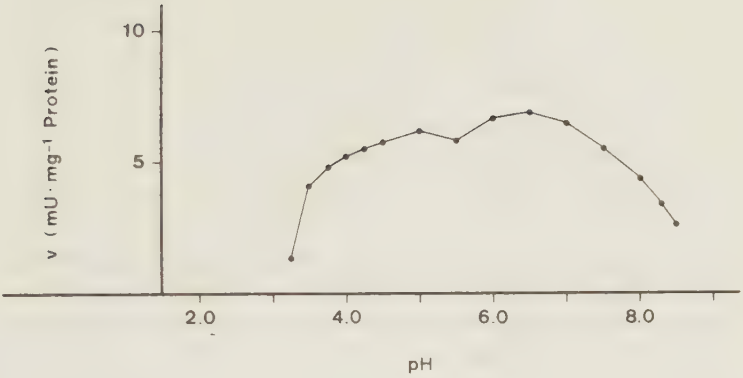


Abb. 12: pH-Abhängigkeit der α-Glucosidase aus Leukozyten eines Erwachsenen (28 J., männl.) mit Maltose 20 mM als Substrat

cosidase. Ihr Anteil an der Gesamtaktivität bei pH 4,0 liegt zwischen 20 und 50 %. Zytoplasmatische neutrale α-Glucosidase ist nur wenig zu finden, sie stellt bei ihrem pH-Optimum von 6,0 etwa 20 % der Aktivität.

Somit enthalten Leukozyten nahezu das gleiche Enzymmuster wie Nieren. Ob eine ähnliche Aktivitätsentwicklung des renalen Enzyms stattfindet, konnte wegen fehlenden Materials nicht untersucht werden. Bakhru-Kishore et al. (5) haben Aktivitätsunterschiede zwischen Erwachsenen und Kindern festgestellt, während Dreyfus et al. (37) bei Kindern keine niedrigere Aktivität fanden.

4.2.4 Amnionzellen

Zur pH-Abhängigkeit der α-Glucosidase von kultivierten Amnionzellen sind in Abb. 13 zwei Kurven dargestellt, zwischen denen ein erheblicher Aktivitätsunterschied besteht. Trotz der unterschiedlichen Höhe ergibt sich

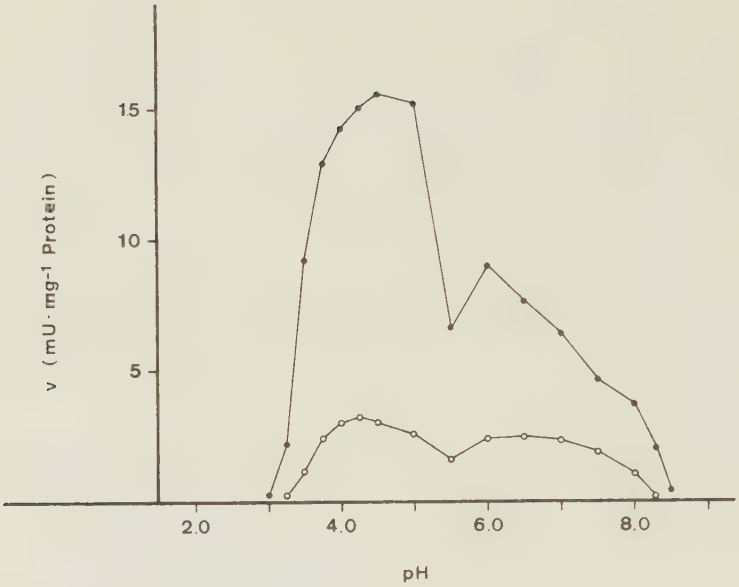


Abb. 13: pH-Abhängigkeit der α-Glucosidase aus kultivierten Amnionzellen mit Maltose 20 mM als Substrat:
(●) Gemisch von fünf Kulturen (Brutdauer 4 bis 6 Wochen) und (o) einzelne Zellkultur (Brutdauer 18 Tage)

ein ähnlicher zweigipfliger Verlauf mit einem pH-Optimum bei pH 4,5 bzw. 4,25 und einem zweiten niedrigeren bei pH 6,0 bzw. 6,5.

Zweigipflige Verläufe mit den genannten pH-Optima werden auch von Fujimoto et al. (44) und Butterworth et al. (19) genannt. Die Relationen der beiden Gipfel für verschiedene Zellkulturen fallen dabei oft recht unterschiedlich aus. Da Dreyfus et al. (37) mit einem Antiserum gegen renale Maltose bei Amnionzellen keine Wirkung beobachtete, ist daraus zu folgern, daß der erste Gipfel dem sauren Enzym entspricht, während der zweite vom neutralen Enzym (mit relativ hoher Aktivität) gebildet wird.

Die Differenz in der Aktivität der Kurven erklärt sich aus zwei Gründen:

1. Die niedrige Aktivitätskurve stammt von einer Zellkultur, die 18 Tage im Brutschrank gezüchtet worden war. Die hohe Aktivität ergab sich aus einem Gemisch von fünf Kulturen mit einer Brutdauer von 4 bis 6 Wochen. Da eine ganze Reihe von Autoren (12,18,29,45,88,100) eine starke Zunahme der spezifischen Aktivität der α-Glucosidase mit zunehmender Kultivierungsdauer beschrieben, ist aus dieser Tatsache der Aktivitätsunterschied der beiden Kurven zum Teil zu erklären.
2. Die Kultur mit der niedrigeren Aktivität war vorher 18 Tage bei -20°C eingefroren, während die andere ohne Gefrieren sofort verwendet wurde. Wegen der Thermolabilität vor allem des neutralen Enzyms (44,111) könnte hierdurch ein Aktivitätsverlust aufgetreten sein.

4.2.5 Fibroblasten

Die Fibroblasten einer Kontrollperson waren fünf Wochen kultiviert worden und danach zwei Wochen bei -20°C gelagert gewesen. Ihre α-Glucosidase besitzt ein pH-Optimum bei pH 4,5 (Abb. 14) mit einer recht hohen Aktivität.
Die pH-Kurven in den Arbeiten von Salafsky et al. (102, 103) und Fujimoto et al. (44) haben im Vergleich zwar eine ähnliche Form im sauren Bereich, ihr relativer Anteil an neutraler Aktivität ist jedoch geringer, was mit der Inaktivierung der neutralen α-Glucosidase durch Gefrieren erklärt wird. Die Untersuchungen von Reuser et al. (100) ergaben demgegenüber für neutrale pH-Werte ähnliche Aktivitäten wie in dieser Arbeit. Mit MUFG als Substrat liegt die Aktivität des neutralen Enzyms sogar über der des sauren (19,100,103).
In Abb. 14 ist noch eine zweite Kurve zu sehen, die im sauren Bereich keine und zwischen pH 5,5 und 8,5 noch geringe Aktivität zeigt. Dabei handelt es sich um Fibroblasten von einem Patienten mit Glykogenose Typ II (infantile Variante), die acht Wochen eingefroren waren.

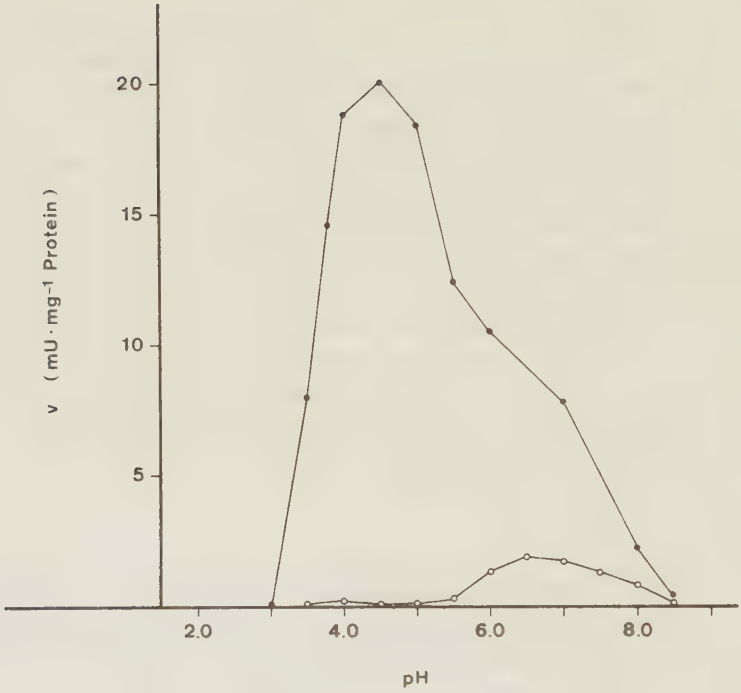


Abb. 14: pH-Abhängigkeit der α-Glucosidase aus kultivierten Fibroblasten mit Maltose 20 mM als Substrat: (●) normale Fibroblasten und (o) Pompe-Fibroblasten

Fehlende Aktivität der sauren α-Glucosidase in Fibroblasten von Morbus Pompe-Patienten wird von mehreren Autoren (15,27,65,89,100,102,103) beschrieben. Da eine Aktivitätsminderung durch Antikörper gegen renale Maltose bei Fibroblasten nicht gefunden wurde (37), ist die Restaktivität im neutralen Bereich demnach der zytoplasmatischen neutralen α-Glucosidase zuzuschreiben; d.h. in Fibroblasten existieren nur die saure und die neutrale α-Glucosidase. Ob die Empfindlichkeit der letzteren gegenüber Kälte so groß ist wie berichtet (44), erscheint zweifelhaft, zumindest bei einmaligem Gefrieren,

da hierbei beide Zellkulturen dieser Arbeit noch eindeutige Aktivitäten im neutralen Bereich aufweisen.

4.3 Vergleich der spezifischen Aktivität der α-Glucosidase aus den verschiedenen Proben

Tabelle 1 bietet eine Übersicht über die spezifische Aktivität der α-Glucosidase in verschiedenen Organen und Zellen mit Maltose als Substrat. Die pH-Werte werden so gewählt, daß die Maxima im sauren und neutralen Bereich sowie die Restaktivität bei pH 8,5 erfaßt werden.

Probe		Alter	pH-Wert (Aktivität in mU/mg)				
			4,0	4,5	6,0	6,5	8,5
Leber	fötal	24.SSW	16,2	13,7	3,8	2,5	0,1
		14.SSW	15,4	13,0	3,7	2,6	0,1
	adult	47 J.	38,0	33,7	8,5	5,0	0,2
		40 J.	135	121	28,5	17,0	0,7
	reines Enzym	1-57 J.	*) 70	65	14,7	7,8	0
Niere	fötal	20.SSW	31,4	30,5	19,1	17,0	5,0
		14.SSW	12,1	11,4	7,6	7,5	2,7
	adult	40 J.	61,0	66,5	73,5	73,5	30,3
Leukozyten		28 J.	5,2	5,8	6,7	6,9	2,6
Amnionzellen		Einzelkultur	3,0	3,0	2,4	2,5	0,1
		Gemisch	13,4	15,6	9,0	7,6	0,4
Fibroblasten		normal	19,0	20,0	10,5	8,5	0,5
		Pompe	0,1	0,05	1,3	1,9	0,05

Tabelle 1: Spezifische Aktivität der α-Glucosidase von Organen und Zellen bei verschiedenen pH-Werten mit Maltose 20 mM als Substrat.
*) Das Enzym wurde von Herrn Dr. v. Rücker freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Enzymeinheit beträgt U/mg Protein

Die höchsten Aktivitätswerte wurden mit der Leber eines 40jährigen erzielt. Die Niere derselben Person wies eine um etwa die Hälfte geringere Enzymaktivität auf. Bei einem Föten der 14. SSW lagen die Werte für die Leber nur geringfügig höher als die für die Niere. Damit konnten die Ergebnisse von Steinitz et al. (118) nicht bestätigt werden, die die Niere als das Organ mit der höchsten Aktivität an α-Glucosidase beschrieben. Innerhalb verschiedener Probanden konnten recht große Unterschiede bezüglich der spezifischen α-Glucosidase-Aktivität eines bestimmten Organs festgestellt werden. So ergaben sich für eine weitere Niere eines Föten aus der 20. SSW mehr als doppelt so hohe Werte als bei dem Föten aus der 14. SSW, während bei einer Leber der 24. SSW gegenüber der von der 14. SSW kein nennenswerter Unterschied zu beobachten war. In der Leber eines 47jährigen Erwachsenen war demgegenüber eine sehr viel geringere α-Glucosidase-Aktivität zu finden als bei dem 40jährigen. Die spezifische Aktivität der Amnionzellen (Gemisch) und Fibroblasten liegen etwa in demselben Bereich wie die fötalen Organe. Die niedrigste Aktivität fand sich in den Leukozyten eines Erwachsenen.
Vergleiche mit Werten aus der Literatur erscheinen nur dann sinnvoll, wenn die Organe bzw. Zellen nach demselben Verfahren aufbereitet wurden; bei Salafsky und Nadler (103) ist das der Fall. Wenn man ihre Ergebnisse mit denen der Tab. 1 vergleicht, so ergeben sich nur Ähnlichkeiten in den Verhältnissen der Aktivität der einzelnen Organe und Zellen zueinander. Die absoluten Aktivitätswerte liegen bei den eigenen Ergebnissen - bis auf die Leukozyten - durchweg höher.
Veränderungen der spezifischen Aktivität der α-Glucosidase während der Ontogenese und neonatalen Entwicklung wurden bisher nur von Schaub et al. (105) an der Leber von Ratten untersucht. Sie hatten einen vierfachen Anstieg der Enzymaktivität während der letzten Fötaltage festgestellt.

Aus den eigenen Ergebnissen kann man beim Vergleich der Aktivität von fötalen zu adulten Organen (Leber bzw. Niere) bei letzteren eine zwei- bis achtfach höhere Aktivität ablesen, wobei die Enzymverteilung bei den Lebern identisch, bei den Nieren jedoch verschieden ausgestaltet ist. Ob die Enzymentwicklung während der Fötalzeit oder danach erfolgt, kann wegen der geringen Anzahl an verschiedenen Probanden nicht gesagt werden.

4.4 Enzymkinetische Eigenschaften der α-Glucosidase

4.4.1 Michaeliskonstante mit Maltose als Substrat

Zur graphischen Ermittlung der Michaeliskonstante (s.a. 3.8.1) wurden Maltosekonzentrationen von 1,6 bis 300 mM eingesetzt. Als Puffer fand ein 0,1 M Na-Acetatpuffer mit pH 4,0 Verwendung.

4.4.1.1 Leber

Zum Vergleich mit menschlichen Organen wurde die Michaeliskonstante von einem Rattenleberkonzentrat bestimmt. Aus der graphischen Auftragung der Versuchsergebnisse nach Lineweaver und Burk (Abb. 15) ergibt sich ein K_m-Wert von 7,4 mM.

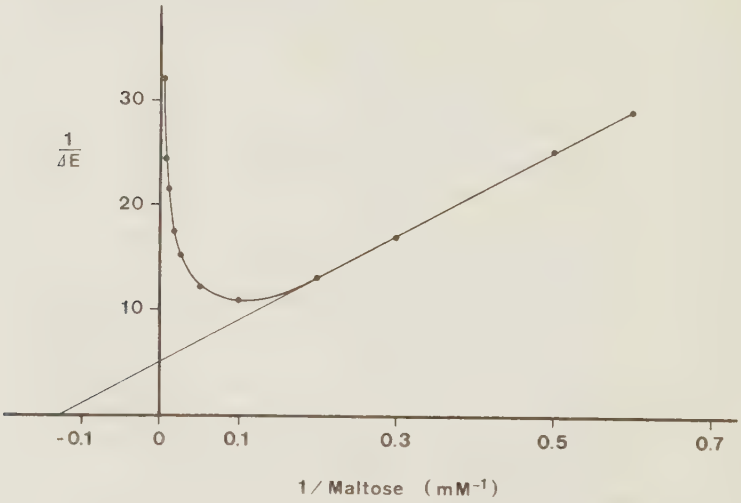


Abb. 15: Lineweaver-Burk-Diagramm zur graphischen Bestimmung von K_m der α-Glucosidase eines Rattenleberkonzentrats mit dem Substrat Maltose bei pH 4,0

Andere Autoren hatten für Rattenleber K_m-Werte um 4 mM gefunden (4,62,71). Tomm (123) lag mit 1,6 bis 2,2 mM noch darunter, während de Barsy et al. (28) mit 7,3 mM nahezu dasselbe Ergebnis erzielt hatten.
Deutlich ist in Abb. 15 eine Hemmung der Enzymaktivität ab 5 mM Maltose zu sehen, die mit steigender Substratkonzentration weiter zunimmt. Dieselben Beobachtungen wurden von Jeffrey et al. (62) und de Barsy et al. (28) verzeichnet.

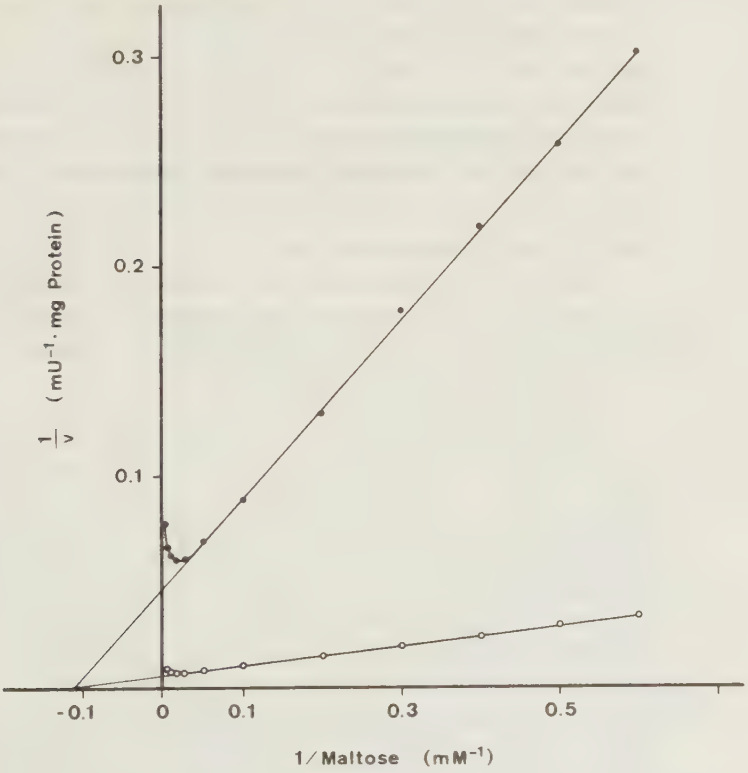


Abb. 16: Lineweaver-Burk-Diagramm zur graphischen Bestimmung von K_m der α-Glucosidase aus Humanleber mit dem Substrat Maltose bei pH 4,0: (●) Fötus (14. SSW, männl.) und (o) Erwachsener (40 J., männl.)

Das Ergebnis der Versuche mit Leberhomogenaten eines Föten (14. SSW, männl.) und eines Erwachsenen (40 J., männl) zeigt Abb. 16. Für beide liegt K_m einheitlich bei 9,1 mM. Insgesamt waren zehn Bestimmungen mit Leberenzym durchgeführt worden, woraus sich für K_m ein Mittelwert von 9,5 mM errechnete. Eine Abnahme der Aktivität ist erst ab einer Substratkonzentration von ca. 60 mM zu verzeichnen und dann in einem viel geringeren Maße als bei Rattenleber.
In der Literatur finden sich für die Leber von Adulten nahezu gleiche K_m-Werte von Koster et al. mit 10 mM und von Murray et al. mit 8,9 mM. Sie beobachteten bis zu einer Maltosekonzentration von 80 mM keine Substrathemmung. Lediglich Gamklou et al. weicht mit einem K_m-Wert von 4,0 mM und einer Substrathemmung ab 4,4 mM von den übrigen Veröffentlichungen ab (48).

Daß für die fötale Leber derselbe K_m-Wert ermittelt wurde, ist neben demselben pH-Optimum und derselben Enzymverteilung (s. 4.3.1) als weiterer Hinweis zu werten, daß in Föten wie in Erwachsenen dieselbe saure α-Glucosidase enthalten ist.

4.4.1.2 Niere

Beim Auftragen der Werte für die Nieren im Lineweaver-Burk-Diagramm bildeten die einzelnen Punkte keine Gerade, sondern eine rechtskonvexe Kurve, die bei der adulten Niere so flach verläuft, daß sie bei dem gewählten Maßstab nur schwer zu erkennen ist (Abb. 17). Da die Testbedingungen gegenüber den Messungen mit der Leber nicht verändert wurden, gelten die Möglichkeiten, die unter 3.8.3 erörtert wurden, d.h. es handelt sich entweder um ein allosterisches Enzym oder es sind zwei verschiedene Enzyme wirksam. Nachdem Dreyfus et al. (37) veröffentlich hatte, daß in der Niere und in Leukozyten bei einem pH-Wert von 4,0 zwei α-Glucosidasen aktiv

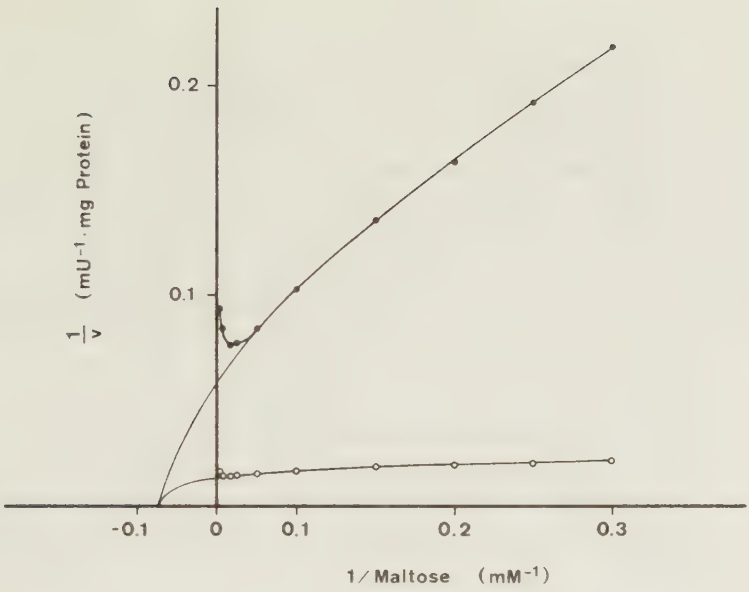


Abb. 17: Lineweaver-Burk-Diagramm zur graphischen Bestimmung von K_m der α-Glucosidase aus Humanniere mit dem Substrat Maltose bei pH 4,0: (●) Fötus (14. SSW, männl.) und (o) Erwachsener (40 J., männl.)

sind, konnte man von dieser Tatsache ausgehen.
Um die Aktivitätsverteilung und die K_m-Werte der Enzyme einigermaßen zu bestimmen, wurde das unter 3.8.3 beschriebene Näherungsverfahren angewendet. Bei der Erwachsenenniere (40 J. männl.) wurde ein K_m-Wert von 14 mM errechnet, für die renale α-Glucosidase dagegen 0,8 mM. Das bedeutet, daß das renale Enzym eine wesentlich höhere Affinität gegenüber Maltose aufweist. In der Aktivitätsverteilung stellt es mit 85 % den Hauptteil der Gesamtaktivität, der Rest entfällt auf die saure α-Glucosidase.
Ein K_m-Wert für die saure α-Glucosidase einer Niere von Adulten wurde bisher nur von Auricchio et al. (4) mit 13,6 mM beschrieben. Für das renale Enzym von Menschen fanden de Burlet et al. (31) einen K_m-Wert von 0,8 mM. Beide Werte bestätigen die eigenen Ergebnisse.

Auch für die erstmaligen Untersuchungen an der Niere eines Föten (14. SSW, männl.) wurde das oben angegebene Verfahren angewendet. Die errechneten bzw. graphisch ermittelten K_m-Werte betragen für die saure α-Glucosidase 12,5 mM und für die renale 1,4 mM. Die beiden Werte decken sich nicht ganz mit den Ergebnissen für die adulte Niere. Da jedoch mit dem Verfahren nur Näherungswerte zu erreichen sind, erscheinen sie hinreichend genau, um daraus den Schluß zu ziehen, daß in der adulten und fötalen Niere dieselben α-Glucosidasen enthalten sind.
In der Aktivitätsverteilung ergibt sich dagegen ein deutlicher Unterschied, den man nach den ungleichen pH-Kurven auch erwarten konnte. Etwa 60 % der Gesamtaktivität stellt das saure Enzym, während die restlichen 40 % durch die renale α-Glucosidase gebildet werden.

4.4.1.3 Leukozyten

Noch wesentlich ausgeprägter als bei der Niere trat bei der Auswertung der Leukozytenwerte eine rechtskonvex gekrümmte Kurve in Erscheinung (Abb. 18), die auch hier auf die gleichzeitige Aktivität von zwei verschiedenen α-Glucosidasen zurückzuführen ist (37). Das Näherungsverfahren erbrachte für die saure α-Glucosidase einen K_m-Wert von 14 mM, für die renale 1,2 mM; sie bewegen sich damit in derselben Größenordnung wie die Werte für die Niere.
Bisher waren nur von einer niederländischen Arbeitsgruppe K_m-Werte in Arbeiten erschienen. Sie betrugen 11 mM (132) und 2,6 - 3,4 mM (64). Die uneinheitlichen Werte deuten darauf hin, daß die Autoren für Leukozyten ebenfalls keine Gerade fanden, ohne das Ergebnis jedoch richtig zu interpretieren, so daß zumindest einmal nur ein Zwischenwert angegeben wurde.

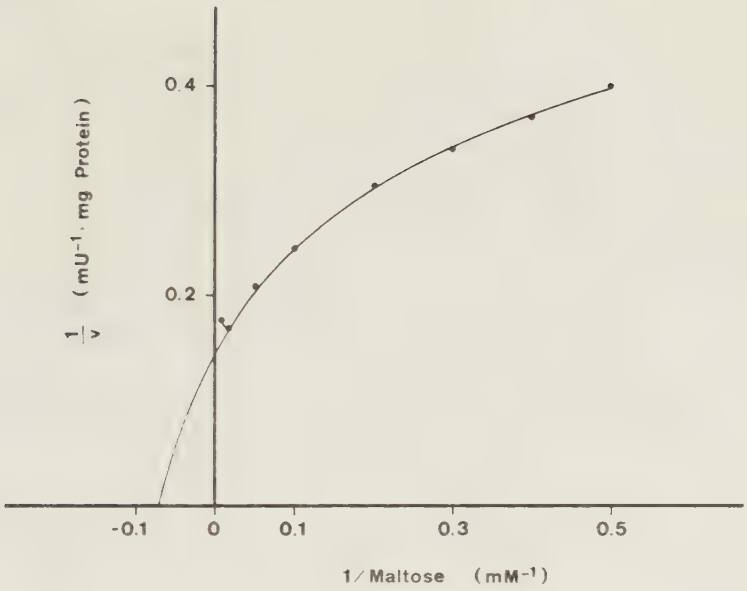


Abb. 18: Lineweaver-Burk-Diagramm zur graphischen Bestimmung von K_m der α-Glucosidase aus Leukozyten eines Erwachsenen (28 J., männl.) mit dem Substrat Maltose bei pH 4,0

Die Aktivitätsverteilung der Leukozyten ähnelt der bei der fötalen Niere: ca. 65 % der Aktivität durch das saure Enzym, 35 % durch das renale.

4.4.1.4 Amnionzellen und Fibroblasten

Wie Abb. 19 zeigt, ergaben sich bei beiden Zellarten eindeutige Geraden mit den K_m-Werten 16,0 mM sowohl für Amnionzellen wie für Fibroblasten. Daraus folgt, daß bei beiden nur ein Enzym wirksam ist. Wie bei der Leber findet sich auch hier ein leichter Aktivitätsrückgang ab ca. 60 mM Maltose.
Für Amnionzellen ist bisher keine Michaeliskonstante bekannt, für Fibroblasten fanden Swallow et al. (121)

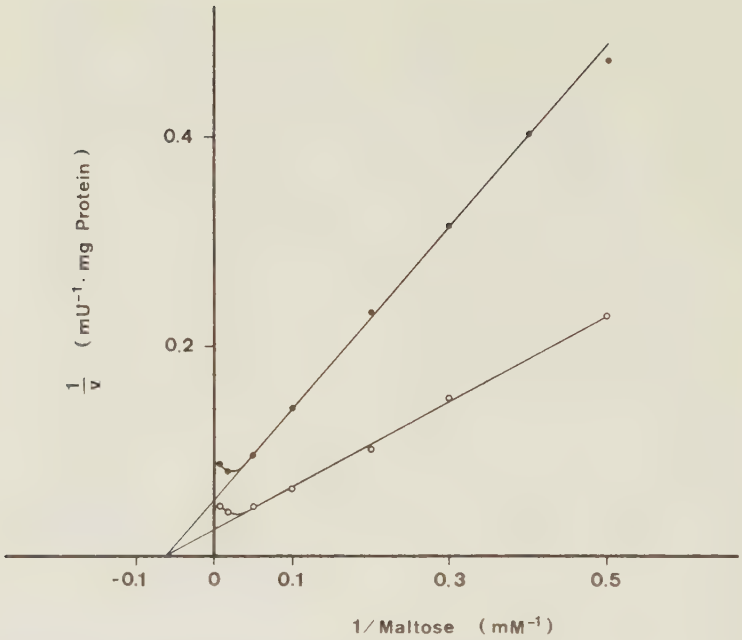


Abb. 19: Lineweaver-Burk-Diagramm zur graphischen Bestimmung von K_m der α-Glucosidase aus (●) Amnionzellen und (○) Fibroblasten mit dem Substrat Maltose bei pH 4,0

7,0 und 8,3 mM, Reuser et al. (100) 11,9 mM. Die eigenen Werte liegen etwas höher als diese Angaben aus der Literatur und auch im Vergleich zu den eigenen Ergebnissen mit saurer α-Glucosidase. Ob die Abweichung durch die Testbedingungen - niedrige Proteinkonzentrationen und längere Inkubationszeiten - verursacht ist oder auf ein Isoenzym mit etwas verschiedenen enzymkinetischen Eigenschaften zurückgeht, kann hieraus nicht entschieden werden.

4.4.2 Michaeliskonstante mit Maltotriose als Substrat

Mit Maltotriose wurde bei einem weiteren Maltosaccharid die Michaeliskonstante bestimmt, wobei Substratkonzentrationen von 2 bis 60 mM Maltotriose verwendet wurden. Wie bei den vorhergehenden Versuchen wurde ein 0,1 M Na-Acetatpuffer mit pH 4,0 eingesetzt.
Es wurde eine Bestimmung mit dem Leberhomogenat eines Föten (24. SSW, männl.) durchgeführt (Abb. 20): K_m ergab 6,2 mM; außerdem ist ein Rückgang der Enzymaktivität ab 10 mM Maltotriose zu sehen.
Die bisher aus Tierexperimenten bekannten Michaeliskonstanten für Maltotriose betragen für die saure α-Glucosidase von Kaninchenmuskel 1,8 mM (90) und für

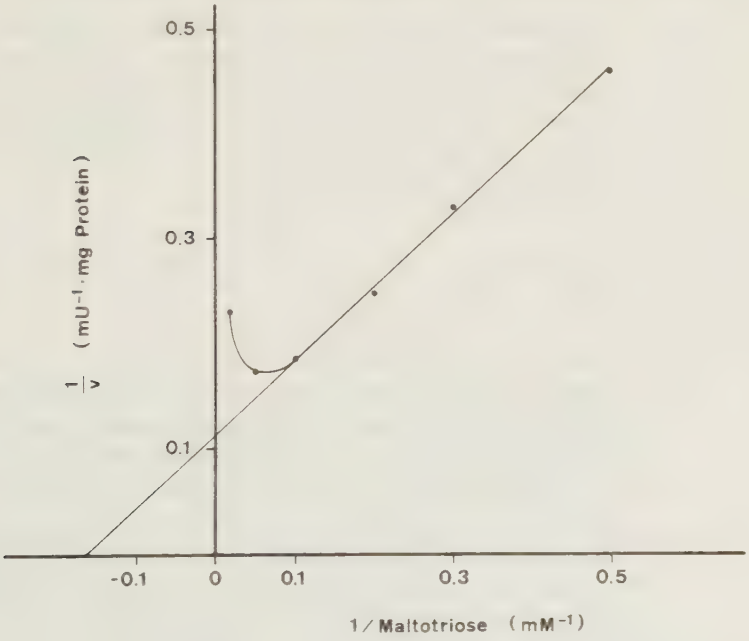


Abb. 20: Lineweaver - Burk-Diagramm zur graphischen Bestimmung von K_m der α-Glucosidase aus der Leber eines Föten (24. SSW, männl.) mit dem Substrat Maltotriose bei pH 4,0

das neutrale Enzym aus demselben Gewebe 1,2 mM (23). Die renale α-Glucosidase des Menschen weist für Maltotriose einen K_m-Wert von 0,35 mM (31) auf. In allen Fällen liegt der K_m-Wert für Maltotriose niedriger als für Maltose. Ebenso ist bei allen drei Fällen eine deutliche Substrathemmung beschrieben, obwohl diese mit Maltose als Substrat beim neutralen und renalen Enzym nicht festgestellt worden war. Hierin besteht eine Ähnlichkeit im Verhalten zu den hier dargestellten Ergebnissen.

4.4.3 Michaeliskonstante mit Glykogen als Substrat

Da Glykogen das eigentliche physiologische Substrat der sauren α-Glucosidase darstellt, wurden für Leber und Niere auch mit diesem Substrat die Michaeliskonstanten bestimmt. Dabei wurden Substratkonzentrationen von 4 bis 125 mg Glykogen/ml Lösung und ein 0,1 M Na-Acetatpuffer pH 4,0 eingesetzt.

4.4.3.1 Leber

Fötale (14. SSW, männl.) und adulte (40 J., männl.) Leber ergaben identische Michaeliskonstanten von jeweils 21 mg/ml (Abb. 21). Eine eindeutige Aktivitätsabnahme bei hohen Substratkonzentrationen ist bis 100 mg/ml nicht zu erkennen. Daß hier, wie bei den Versuchen mit Maltose, die K_m-Werte als einer wichtigen kinetischen Eigenschaft übereinstimmen, bekräftigt weiter die Annahme, daß zwischen fötaler und adulter saurer α-Glucosidase kein Unterschied besteht. Versuche anderer Autoren mit Glykogen brachten zum größten Teil K_m-Werte in demselben Bereich: für Humanleber 25 mg/ml (80), für Humanplazenta 20 mg/ml (28) und für Fibroblasten vom Menschen 29,7 mg/ml (100).

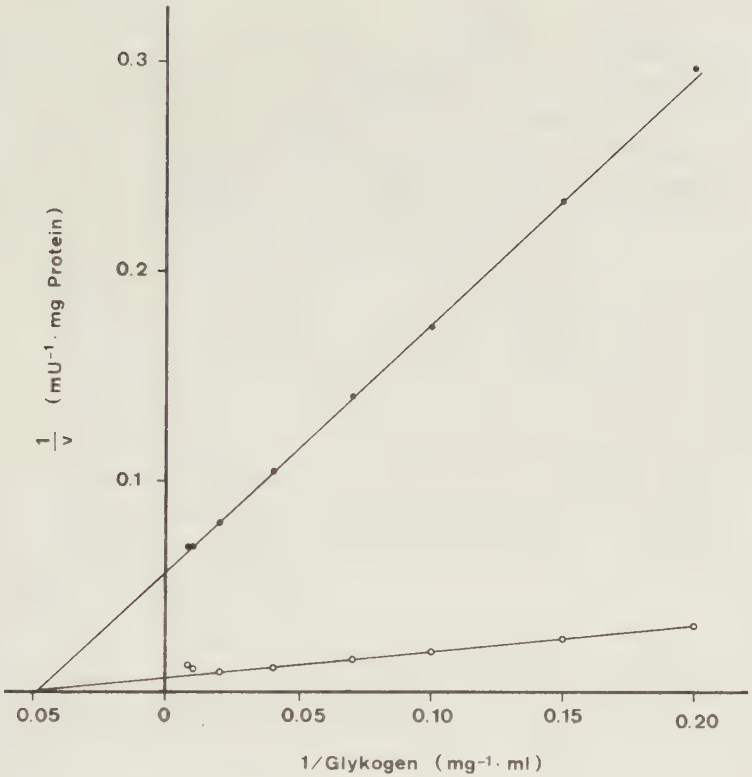


Abb. 21: Lineweaver-Burk-Diagramm zur graphischen Bestimmung von K_m der α-Glucosidase aus Humanleber mit dem Substrat Glykogen bei pH 4,0:
(●) Fötus (14. SSW, männl.) und (o) Erwachsener (40 J., männl.)

Nur Koster et al. (68) liegen für Humanleber mit 50 mg/ml deutlich über diesen Werten. Vergleiche von Michaeliskonstanten mit Glykogen sind allerdings nur mit Einschränkungen möglich (62), da das Glykogen je nach Herkunft - Species aus der es gewonnen wurde - im Aufbau und Molekulargewicht Unterschiede aufweist, welche seine Hydrolyse beeinflussen können.

4.4.3.2 Niere

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Maltose als Substrat zeigten sich mit den Nierenhomogenaten eines Föten (14. SSW, männl.) und eines Erwachsenen (40 J., männl.) bei der graphischen Darstellung eindeutige Geraden (Abb. 22) mit K_m-Werten, die zwar nicht identisch, mit 33 mg/ml für die adulte und 31 mg/ml für die fötale

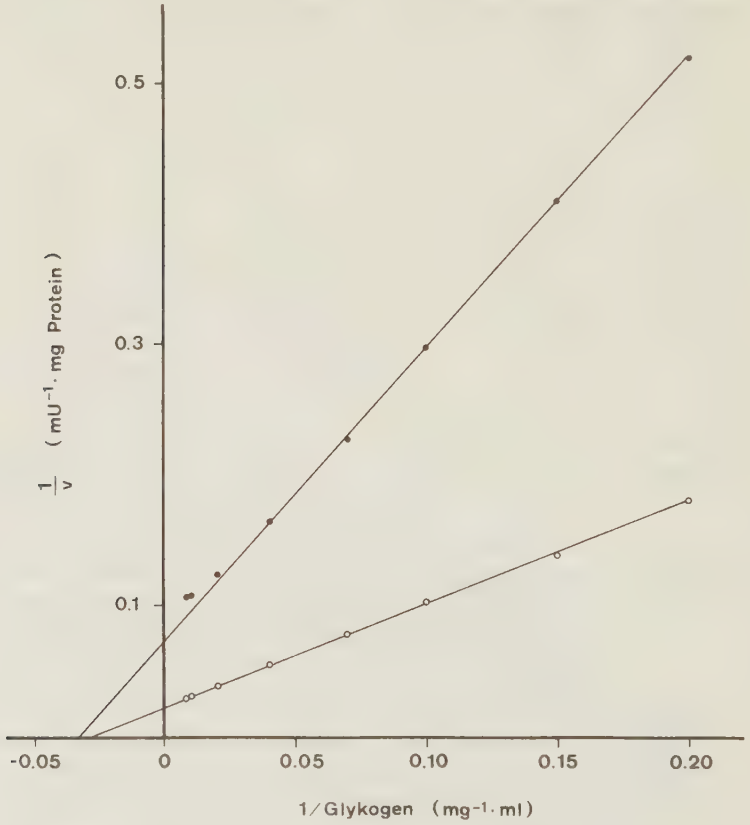


Abb. 22: Lineweaver-Burk-Diagramm zur graphischen Bestimmung von von K_m der α-Glucosidase aus Humanniere mit dem Substrat Glykogen bei pH 4,0:
(●) Fötus (14. SSW, männl.) und (o) Erwachsener (40 J., männl.)

Niere jedoch sehr nahe beieinander liegen; die Abweichung liegt innerhalb der allgemeinen Fehlerbreite.

Schwieriger ist der Unterschied zu den Ergebnissen mit der Leber zu interpretieren. Da sich bei der Auftragung im Lineweaver-Burk-Diagramm Geraden ergeben, kann im wesentlichen nur ein Enzym wirksam sein (35); Torres (124) benützt dies sogar als Kriterium für die Reinheit eines Enzyms. Als vorläufige Erklärungsmöglichkeiten bleiben nur, daß die Niere entweder eine saure α-Glucosidase aufweist, die in ihrem hydrolytischen Verhalten gegenüber Glykogen vom Leberenzym abweicht, oder daß das Ergebnis fast ausschließlich durch die Aktivität der renalen α-Glucosidase zustande kommt.
De Burlet et al. (31) erzielten für sie einen K_m-Wert von 27 mg/ml für Glykogen. Für die saure α-Glucosidase der Niere ist aus der Literatur keine Michaeliskonstante bekannt, so daß hier keine Vergleichsmöglichkeiten gegeben sind.

4.4.4 Hemmung der Enzymaktivität

4.4.4.1 Zugabe von Turanose

Bei Turanose handelt es sich um ein Disaccharid, das aus Glucose und Fructose besteht, die über eine 3-α-Verbindung miteinander verknüpft sind. Um den Einfluß auf die Aktivität der sauren α-Glucosidase zu messen, wurden zu Substratkonzentrationen von 2 bis 150 mM Maltose konstante Turanosekonzentrationen von 1 bzw. 5 mM gegeben. Als Proben dienten die Lebern eines Erwachsenen (47 J., männl.) und eines Föten (24. SSW, männl.). Das Ergebnis der Messungen mit der adulten Leber ist in Abb. 23 graphisch dargestellt.
Daraus ist zu entnehmen, daß die Enzymaktivität bei einer bestimmten Substratkonzentration mit zunehmender Turanosekonzentration gegenüber der Kontrolle (ohne

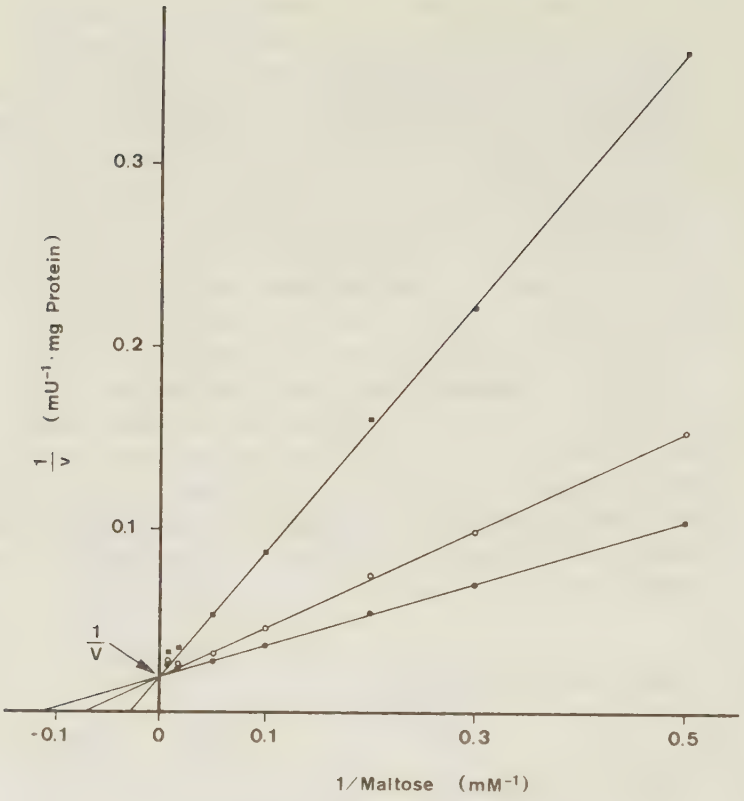


Abb. 23: Lineweaver-Burk-Diagramm zur graphischen Bestimmung von K_m der α-Glucosidase aus Humanleber (47 J., männl.) mit dem Substrat Maltose bei pH 4,0 unter Zugabe von Turanose: (●) Kontrolle (ohne Turanose) (o) 1 mM und (■) 5 mM Turanose

Turanose) deutlich abnimmt. Als Hemmtyp ergibt sich nach den Ausführungen unter 3.8.2.1 eindeutig eine kompetitive Hemmung, da sich die Geraden in einem Punkt auf der Ordinate schneiden. Der gemeinsame Schnittpunkt ergibt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V. Sie wird durch den Inhibitor nicht verändert, weil er theoretisch durch eine sehr hohe Substratkonzentration aus seiner Bindung mit dem Enzym verdrängt wird.

Durch die 1/v-(I)-Auftragung nach Dixon (34) kann die Hemmkonstante auf einfache Weise bestimmt werden. K_i ist gleich der Inhibitorkonzentration, welche die Steigung in der Auftragung nach Lineweaver und Burk verdoppelt (110); je kleiner K_i, desto stärker die Hemmung. Abb. 24 zeigt das Dixon-Diagramm aus den Versuchsergebnissen mit der Erwachsenenleber. Die Koordinaten des Schnittpunktes der Geradenschar ergeben $-K_i$ und 1/V; K_i ist gleich 1,7 mM.

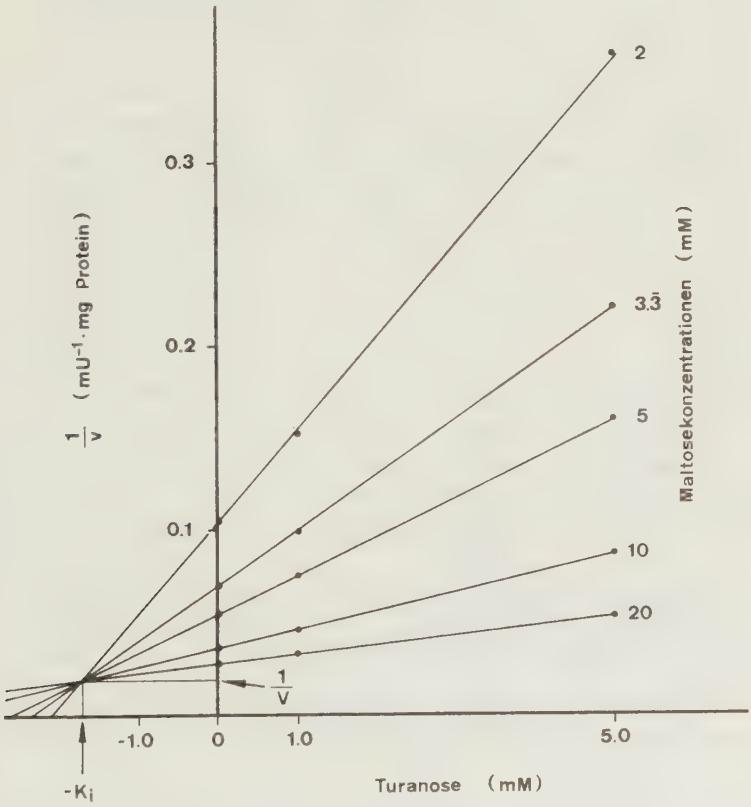


Abb. 24: Dixon-Diagramm zur graphischen Bestimmung der Hemmkonstante K_i der α-Glucosidase aus Humanleber (Erwachsener 47 J., männl.) mit Turanose als Inhibitor und Maltose als Substrat bei pH 4,0

Mit der fötalen Leber ergaben sich derselbe Hemmtyp und K_i-Wert, so daß eine weitere Übereinstimmung in den kinetischen Eigenschaften des Leberenzyms nachgewiesen wurde.
In Tabelle 2 sind zum Vergleich die wichtigsten bisherigen Versuche mit Turanose zusammengestellt. Die beste Übereinstimmung mit den eigenen Werten weisen die Ergebnisse von Bruni et al. (16) auf. Ein einheitliches Verhalten beim Menschen läßt sich aus der Zusammenstellung nicht ablesen. Für die Leukozyten (64) ist wiederum nicht berücksichtigt, daß zwei Enzyme aktiv sind.

Autor	Organ Art d. α-Glucosidase	K_i (mM)	Hemmtyp
Bruni et al. (16)	Rinderleber saure	1,4	kompetitiv
Jeffrey et al. (62)	Rattenleber saure	2,8	Mischtyp
Palmer (91)	Kaninchenmuskel saure	2	Mischtyp
Carter et al. (23)	Kaninchenmuskel neutrale	70	nicht-kompetitiv
Koster et al. (64)	Leukozyten (Mensch) saure + renale	52-68	nicht-kompetitiv
Koster et al. (64)	Muskel (Mensch) saure	4,2	kompetitiv
de Burlet et al. (31)	Niere (Mensch) renale	5	kompetitiv

Tabelle 2: Ergebnisse aus der Literatur mit Turanose als Inhibitor der α-Glucosidase und mit Maltose als Substrat

4.4.4.2 Zugabe von Glucose

Um den Einfluß von Glucose auf die Aktivität der α-Glucosidase zu bestimmen, wurden zu Reaktionsgemischen mit 1 und 10 mM Maltose jeweils 1,5 bzw. 3 mM Glucose gegeben, und nach entsprechender Reaktionszeit die Extinktionsänderung gemessen. Durch die zusätzliche Glucose erhöht sich entsprechend der Leerwert, so daß hohe Extinktionswerte auftreten, welche die Genauigkeit der Messungen beeinträchtigen.
Die Aktivität eines Leberhomogenats (40 J., männl.) wurde durch Glucose kompetitiv gehemmt. Dies war zu erwarten, da die Glucose als Produkt der katalytischen Reaktion nahezu zwangsläufig um denselben Bindungsort konkurriert oder ihn zumindest bis zur Abspaltung blokkiert. Die Hemmkonstante liegt dabei in einem Bereich von 5 - 10 mM.
Eine Hemmung der α-Glucosidase-Aktivität durch Glucose hatte bereits Hers (51) mit seinen Versuchen entdeckt, die von Palmer (91) für das Enzym aus Kaninchenmuskel bestätigt wurde. Torres et al. (124) nannten als eine Erklärungsmöglichkeit für den Abfall der Aktivität mit Rattenleber bei hohen Substratkonzentrationen eine Hemmung durch das Reaktionsprodukt. Eine solche Produkthemmung kann aber nicht oder nur zum Teil vorliegen, weil sie in der graphischen Darstellung eine andere Form aufweist (129).
Die Aktivität der Niere eines Erwachsenen (40 J., männl.) wurde durch Glucose ebenfalls gehemmt, doch scheint hier eine gemischte Hemmung vorzuliegen. Wegen der oben beschriebenen Wirkung von zwei Enzymen ist hier keine einigermaßen sichere Aussage zu treffen.

4.4.4.3 Maltose als eigener Inhibitor (Substrathemmung)

Wie weiter oben ausgeführt, war bei menschlichen Organen meistens ein leichter Rückgang der Enzymaktivität

bei hohen Substratkonzentrationen zu verzeichnen. Stark ausgeprägt ist diese Erscheinung mit dem Konzentrat von Rattenleber. Nach den Ausführungen über Enzymkinetik (s. 3.8.2.2) läßt sich aus der Auftragung nach Dixon (34) die Bindungskonstante für das zweite hemmende Substratmolekül ermitteln.

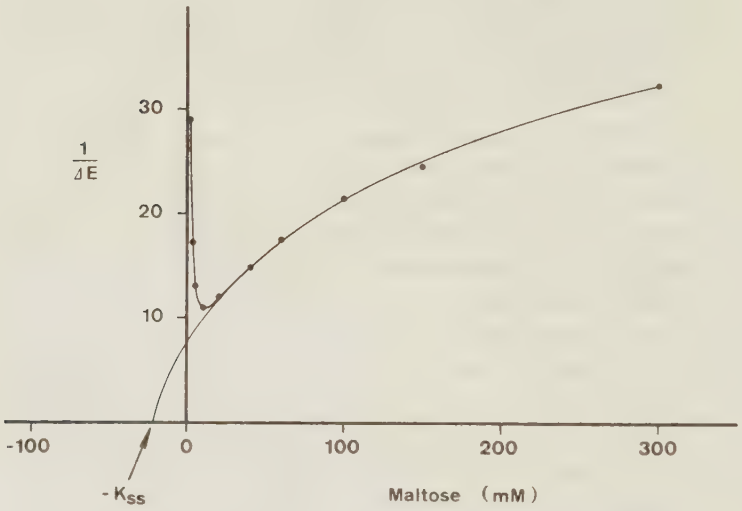


Abb. 25: Dixon-Diagramm zur graphischen Bestimmung der Substrathemmkonstante K_{ss} der α-Glucosidase aus Rattenleber mit dem Substrat Maltose bei pH 4,0

Das Dixon-Diagramm mit der sauren α-Glucosidase aus Rattenleber (Abb. 25) zeigt jedoch für hohe Substratkonzentrationen keine Gerade, sondern eine rechtskonvexe Kurve. Das bedeutet, daß die theoretische Annahme von der Anlagerung eines zweiten hemmenden Substratmoleküls nicht oder nur zum Teil zutrifft.
Es ergeben sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten:
1. Anlagerung von mehr als zwei Substratmolekülen.
2. Der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes wird durch das zweite Substratmolekül nicht vollständig gehemmt,

sondern geschieht weiter mit einer niedrigeren Reaktionsgeschwindigkeit.
3. Zunehmende Transglucosidase-Aktivität des Enzyms bei höheren Substratkonzentrationen, und dadurch verringerte hydrolytische Aktivität.
4. Hemmung der Aktivität durch das sich anhäufende Reaktionsprodukt.
Obwohl sich in Abb. 25 keine Gerade ergibt, wurde die Kurve in der Krümmung auf die Abszisse extrapoliert, um einen annähernden K_{ss}-Wert zu erhalten; er beträgt 22 mM.
Jeffrey et al. (62) berichten von einer Substrathemmkonstante von 62 mM für Maltose. Sie hatten ihr Ergebnis allerdings aus nur drei Punkten im Dixon-Diagramm bestimmt. Palmer (90) fand für Kaninchenmuskel einen K_{ss}-Wert von 80 mM, wobei Konzentrationen von 20 - 85 mM Maltose ausgewertet wurden. Er sprach die Vermutung aus, es handele sich um keine echte Substrathemmung, sondern der Effekt beruhe auf der Transglucosidase-Aktivität der α-Glucosidase. Die Tatsache, daß de Barsy (28) sowohl für die α-Glucosidase von Ratten als auch für die von Menschen etwa die gleiche Transglucolysationsrate gefunden hatte, steht jedoch im Widerspruch zu dieser Annahme. Bei menschlichen Organen wurden mit Maltose und Glykogen von keinem Autor eine Substrathemmung gefunden, mit letzterem Substrat auch nicht bei Tierproben.
Die geringe Abnahme der Enzymaktivität bei den eigenen Versuchen mit Proben vom Menschen wird wahrscheinlich nicht durch eine echte Substrathemmung verursacht, sondern es handelt sich um einen kombinierten Effekt der Hemmung durch die Glucose - die als Produkt erscheint und auch im Substrat mit 0,1 % enthalten ist - und die Transglucosylation. Dagegen muß man für das Rattenleberenzym eine echte Substrathemmung annehmen.

5 DISKUSSION

Bei der Messung von Enzymreaktionen strebt man für alle praktischen Zwecke Substratsättigung an, bei der nach der Michaelis-Menten-Beziehung das Enzym seine maximale Aktivität entfaltet. Normalerweise kann man damit rechnen, daß dies der Fall ist, wenn die Substratkonzentration 10mal größer als K_m ist. Eine Verwendung so hoher Konzentrationen ist manchmal unpraktisch oder sogar unmöglich, wenn z.B. ein hoher Substratüberschuß die Reaktion hemmt oder wenn die Löslichkeit des Substrats zum begrenzenden Faktor wird.

Die Bestimmung der α-Glucosidase-Aktivität wurde nach der ursprünglich von Hers (51) entwickelten Methode vorgenommen, der eine Substratkonzentration von 5,55 mM Maltose eingesetzt hatte. Nach den ersten Messungen zur Ermittlung der Michaeliskonstante wurde klar, daß die von Hers gewählte Konzentration nicht optimal ist. Mit ihr werden Aktivitätswerte erreicht, die etwa 45 % der maximalen, experimentell erreichbaren Aktivität betragen; letztere liegt im Bereich von 60 mM Maltose. Durch die Erhöhung der Maltosekonzentration auf 20 mM bei den eigenen Versuchen betrug die Enzymaktivität nahezu 90 % des Maximums, d.h. gegenüber 5 mM Maltose ergibt sich eine doppelt so hohe Reaktionsgeschwindigkeit der sauren α-Glucosidase. Eine noch höhere Konzentration wurde nicht angestrebt, weil die in der Maltose enthaltene Glucose den Leerwert anhebt und dadurch die Genauigkeit der Messungen beeinträchtigt. Die niedrige Substratkonzentration bei Hers erklärt sich möglicherweise durch seine Versuche mit der α-Glucosidase von Ratten, bei der sich ab 5 mM Maltose eine starke Substrathemmung abzeichnet, die den Einsatz höherer Konzentrationen ausschließt.

Für Glykogen liegt die günstigste Substratkonzentration bei 25 - 50 mg/ml. Neben der Glucose, die auch hier

vorkommt, wird sie durch die Löslichkeit des Substrats begrenzt.
Eine weitere wichtige Verbesserung des Enzymtests brachte die Zentrifugation der rohen Homogenate mit 10.000 g, die nötig war, um für die enzymkinetischen Bestimmungen die störenden Einflüsse weitgehend auszuschalten. Die so erzielte Genauigkeit der Messungen läßt es angezeigt erscheinen, die Zentrifugation auch im Routineverfahren anzuwenden. Der etwas höhere Verbrauch an Material läßt sich durch die höhere Aktivität ausgleichen, so daß für eine Doppelbestimmung der Enzymaktivität von Leber 10 mg Gewebe ausreichen.

Aus den vielen Veröffentlichungen zu den Eigenschaften der sauren α-Glucosidase sind in Tabelle 3 die wichtigsten Ergebnisse zusammengestellt.
Keine großen Unterschiede bestehen beim pH-Optimum, das für Proben von Menschen und Tieren immer im Bereich von pH 4,5 zu finden ist. Die Abweichungen fallen noch in den Rahmen, der durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen gegeben ist.
Dagegen ergeben sich aus den enzymkinetischen Daten eindeutige Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies. So liegt die Michaeliskonstante von Rattenleber durchweg niedriger als bei der Leber von Menschen. Als zweiter wichtiger Unterschied muß die Substrathemmung betrachtet werden, die mit Maltose als Substrat bei der sauren α-Glucosidase von Rattenleber (28,62) und Kaninchenmuskel (90) eindrucksvoll in Erscheinung tritt, während dies beim Menschen nicht der Fall ist. Ob diese Abweichungen in der Enzymkinetik eine andere physiologische Rolle des Enzyms in Tierzellen anzeigen, ist hier bisher nicht bekannt.
Ein Vergleich der spezifischen Aktivität ist nur mit reinen Enzymen sinnvoll. Dabei zeigt sich, daß die von Herrn Dr. v. Rücker zur Verfügung gestellte saure α-Glucosidase aus Humanleber eine doppelt so hohe Aktivität aufweist wie die höchsten sonst bekannten Werte;

Autor		Lejeune et al. (71)	Torres et al. (124)	Fujimori et al. (42)	Auricchio et al. (4)	
Jahr		1963	1964	1968	1968	
Art des Gewebes		Rattenleber	Hundeleber	Rindermilz	Rattenleber	Humanniere
spezifische Aktivität	M			32.320	5.520	4.800
	G			34.460		
pH-Optimum	M	4	4,8	4,3	4,5	4,5
	G		5,2	4,6	5,0	4,7
Michaelis-konstante	M	4 mM	4 - 5 mM		4,7 mM	13,6 mM
	G		16 mg/ml			
Inhibitoren						
Glucose	M	+	K_i = 5,85 mM			
Turanose	M	5 mM 50 %	5 mM 29,5 %		30 mM 90 %	
	M	30 mM 100 %	28 mM 82,5 %			
	G		28 mM 17,5 %		30 mM 90 %	
Substrat-hemmung	M		ab 10 mM			

Tabelle 3a: Literaturübersicht über physikalisch-chemische Eigenschaften der sauren α-Glucosidase mit den Substraten Maltose (M) und Glykogen (G)

Autor		Bruni et al. (16,17)	Jeffrey et al. (61,62)	Palmer (90,91)	de Barsy et al. (28)	
Jahr		1969/70	1970	1971	1972	
Art des Gewebes		Rinderleber	Rattenleber	Kaninchenmuskel	Humanplazenta	Rattenleber
spezifische Aktivität	M	34.000	7.730	6.167	7.300	21.500
	G		11.330			
pH-Optimum	M	4,5	3,7	4,5	4	
	G	4,5	4,4	5,1	4	
Michaelis-konstante	M	10 mM	3,8 mM	3,7 mM	11 mM	7,3 mM
	G	28 mg/ml		24 mg/ml	20 mg/ml	13 mg/ml
Inhibitoren						
Glucose	M					
Turanose	M	K_i = 1,4 mM	K_i = 2,8 mM	K_i = 2 mM		
	M					
	G					
Substrat-hemmung	M	+	K_{ss} = 62 mM	K_{ss} = 80 mM	keine	ab 5 mM

Tabelle 3b: Literaturübersicht über physikalisch-chemische Eigenschaften der sauren α-Glucosidase mit den Substraten Maltose (M) und Glykogen (G)

Autor		Gamklou et al. (48,49)	Koster et al. (67,68)	Reuser et al. (100)	Murray et al. (80)	eigene Ergebnisse
Jahr		1972	1976/77	1978	1978	1980
Art des Gewebes		Humanleber	Humanleber	Fibroblasten	Humanleber	Humanleber
spezifische Aktivität	M	67	13.200		32.700	70.000 *)
	G					
pH-Optimum	M	4,6 - 5,1	4,0 - 4,5	4,4	4,0	4,0
	G		4,5 - 5,0	4,0	4,5	
Michaelis-konstante	M	4,0 $\pm$ 0,2	10 mM	11,9 mM	8,9 mM	9,5 mM
	G		50 mg/ml	29,7 mg/ml	25 mg/ml	21 mg/ml
Inhibitoren						
Glucose	M					5 - 10 mM
Turanose	M					K_i = 1,7 mM
	M					
	G					
Substrat-hemmung	M	ab 4,4 mM	keine		keine bis 80 mM	keine bis 60 mM

Tabelle 3c: Literaturübersicht über physikalisch-chemische Eigenschaften der sauren α-Glucosidase mit den Substraten Maltose (M) und Glykogen (G)
*) Reines Humanleberenzym von Dr. v. Rücker

ein Umstand, der für eine sehr hohe Reinheit dieser Enzympräparation spricht.

In dieser Arbeit wurden erstmals genauere Untersuchungen an fötaler Leber und Niere von Menschen vorgenommen. Dabei zeigte es sich, daß die Leber von Föten und Erwachsenen in der Enzymverteilung, dem pH-Optimum, der Michaeliskonstante für Maltose und Glykogen und der Hemmkonstante und dem Hemmtyp für Turanose übereinstimmen. Damit konnte die Identität der beiden sauren α-Glucosidasen mit großer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden. Als einziger Unterschied ergab sich, daß im Erwachsenenorgan eine größere Menge an Enzym enthalten ist.
Die Ergebnisse von fötaler und adulter Niere bereiteten anfangs Schwierigkeiten, da sie scheinbar auf völlig unterschiedliche K_m-Werte hinwiesen. Mit Hilfe von theoretischen Überlegungen zur Enyzmkinetik und den Ergebnissen von Dreyfus et al. (37) konnte dieses Problem gelöst werden. Es kann mit einiger Sicherheit gesagt werden, daß in der Niere bei pH 4,0 zwei Enzyme mit verschiedenen K_m-Werten aktiv sind, wobei sich die Enzyme von Föten und Erwachsenen nicht unterscheiden.

Interessant erscheint der Unterschied in der Enzymverteilung zwischen Föten und Adulten, auf den die voneinander abweichenden pH-Kurven und das Krümmungsverhalten im Lineweaver-Burk-Diagramm zurückzuführen sind. Beim Erwachsenen werden ca. 85 % der Enzymaktivität von der renalen α-Glucosidase gestellt, während es beim Föten nur 40 % sind, und die saure α-Glucosidase noch überwiegt. Das bedeutet, daß im Laufe der weiteren Entwicklung beim Föten nur mehr das renale Enzym vermehrt wird, während das saure - auf die Gewebemenge bezogen - gleich bleibt.
Als weiterer wichtiger Befund ist das hydrolytische Verhalten der Nierenenzyme gegenüber Glykogen zu werten, wo sich kein Hinweis für die Aktivität von zwei

verschiedenen Enzymen ergab und außerdem der K_m-Wert von dem für die Leber abwich. Möglicherweise ist das renale Enzym für diese Erscheinung verantwortlich.

Dieselben Probleme wie bei der Niere ergaben sich mit Leukozyten, wo bei pH 4,0 ein saures Enzym und ein Enzym, das sich immunologisch wie die renale α-Glucosidase verhält, katalytisch tätig sind. Die errechneten K_m-Werte liegen in demselben Bereich wie die der Nieren.

Die verschiedenen Methoden zur Bestimmung von Heterozygoten aus Leukozyten, die in der Literatur (52,64,66, 87,130) vorgeschlagen werden, demonstrieren in augenfälliger Weise die Schwierigkeiten, damit eine richtige Diagnose zu stellen. Von allen Autoren wurde dabei die renale α-Glucosidase nicht berücksichtigt, die immerhin 20 - 50 % der Gesamtaktivität (37) ausmacht. Eine korrekte Diagnostik ist mit Leukozyten deshalb nur möglich, wenn die Aktivität des renalen Enzyms mit Hilfe von Antikörern wirksam ausgeschlatet wird.
In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Nieren und Leukozyten von homozygoten Merkmalsträgern enzymkinetisch zu untersuchen. Nach den theoretischen Überlegungen müßte sich im Lineweaver-Burk-Diagramm eine Gerade ergeben, wenn das Substrat durch das Fehlen der sauren α-Glucosidase nur noch durch das renale Enzym katalysiert wird.
Die Frage der Bestimmung von Heterozygoten erscheint von sekundärer Natur, da sich bei der pränatalen Diagnose immer nur bei einem homozygoten Fall mögliche Konsequenzen ergeben. Zudem stehen Eltern eines Kindes mit Morbus Pompe als heterozygote Merkmalsträger fest, da es sich um eine autosomal rezessive Erbkrankheit handelt.

Nadler et al. (82,83) hatten zum ersten Mal in Amnionzellen die Aktivität der sauren α-Glucosidase nachweisen können, was bald für die pränatale Diagnose genutzt wurde. Schwierigkeiten ergaben sich, als Fruchtwasser ebenfalls zur Diagnostik herangezogen wurde, bis man feststellte, daß die Aktivität im Fruchtwasser nicht von der sauren α-Glucosidase stammt. Sie kommt vielmehr von desquamierten intestinalen Zellen oder vom renalen Enzym, das mit dem Urin in das Fruchtwasser gelangt.

Auch mit unkultivierten Amnionzellen ergeben sich in der Diagnostik Unsicherheiten, weil die spezifische Aktivität in diesen Zellen oft sehr niedrig ist. Sichere Aussagen lassen sich nur mit Amnionzellen aus Subkulturen treffen.
Amnionzellen und Fibroblasten zeigten in den Versuchsergebnissen geringe Abweichungen gegenüber Leber. Sowohl das pH-Optimum mit pH 4,5 als auch die Michaeliskonstante mit 16 mM liegen in ihren Werten etwas höher als bei der Leber. Außerdem besitzen diese Zellen einen höheren Anteil an neutraler α-Glucosidase, wodurch sich die geringfügigen Abweichungen zum Teil erklären. Umfangreichere enzymkinetische Studien waren nicht möglich, da für die relativ unempfindliche Maltose-Methode zuviel Zellmaterial benötigt wird.

Im folgenden werden die bisher bekannten Gruppen von α-Glucosidasen, die sich aufgrund ihrer physikalisch-chemischen und immunologischen Eigenschaften unterscheiden lassen noch einmal zusammengefaßt und beschrieben.

1. Die saure α-Glucosidase, die in den Lysosomen aller Organe und Zellen (außer Erythrozyten) gefunden wurde, besitzt ein pH-Optimum bei pH 4,0, ihre Michaeliskonstante beträgt beim Menschen ca. 10 mM für Maltose als Substrat. Ihr Fehlen ist kennzeichnend für den Morbus Pompe. Aus der Tatsache, daß die physiologische Rolle des Enzyms darin besteht, sämtliche Polysaccharide

abzubauen, die durch Autophagie in die Lysosomen gelangen, erklärt sich seine breite Substratspezifität.
2. Die neutrale α-Glucosidase ist frei im Zytoplasma der Zellen enthalten; ihr pH-Optimum liegt bei pH 6,5, die Michaeliskonstante ist niedriger als bei der sauren α-Glucosidase. Die Restaktivität in Amnionzellen und Fibroblasten von Fällen mit Morbus Pompe kommt durch ihre Wirkung zustande.
3. Die renale α-Glucosidase (oder Maltase) wurde bisher nur in der Niere und in Leukozyten festgestellt.
In der Niere konnte sie als membrangebundenes Enzym in den proximalen Tubuluszellen lokalisiert werden (119). Sie entfaltet sowohl im neutralen als auch im sauren pH-Bereich eine relativ hohe Aktivität; die Michaeliskonstante ist ungefähr um den Faktor 10 niedriger als bei der sauren α-Glucosidase. Ihre physiologische Rolle ist noch nicht bekannt, bei der Glykogenose Typ II ist ihre Aktivität nicht beeinträchtigt.
4. Von Potier et al. (96) wird eine uneinheitliche Gruppe von α-Glucosidasen aus intestinalen Zellen von Föten beschrieben, deren pH-Optimum sich im Bereich von pH 5,4 - 6,4 befindet und deren K_m-Wert mit Maltose im Mittel 7,8 mM beträgt. Diese Enzyme sollen für den Hauptteil an Aktivität im Fruchtwasser verantwortlich sein.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die ursprünglich von Hers entwickelte Methode zur Bestimmung der lysosomalen sauren α-Glucosidase mit den Substraten Maltose und Glykogen wird modifiziert. Entscheidende Verbesserungen bringen eine Zentrifugation der rohen Homogenate mit 10.000 g und die Erhöhung der Substratkonzentration, die - gegenüber der von Hers gewählten - die Enzymaktivität verdoppelt.
Zum ersten Mal wird die α-Glucosidase aus der Leber und Niere von Föten in ihren katalytischen Eigenschaften genauer untersucht und mit den Organen von Erwachsenen verglichen. Dabei zeigt sich bei der Leber völlige Übereinstimmung in folgenden Merkmalen: Enzymverteilung, pH-Optimum, K_m für Maltose und Glykogen, K_i und Hemmtyp für Turanose als Inhibitor und Maltose als Substrat. Nur die spezifische Aktivität (auf Protein bezogen) liegt bei der Leber von Adulten höher.
Für die Niere wird nachgewiesen, daß bei einem pH von 4,0 zwei verschiedene α-Glucosidasen Maltose spalten. Ihre K_m-Werte, die sich für das fötale und adulte Organ nicht unterscheiden, können mit Hilfe enzymkinetischer Überlegungen bestimmt werden. Die neben der sauren α-Glucosidase enthaltene renale α-Glucosidase stellt in der Erwachsenenniere ca. 85 % der Gesamtaktivität, während sie bei der fötalen Niere nur ca. 40 % beträgt.

Außer den Organen werden noch von Leukozyten, Amnionzellen und Fibroblasten pH-Optimum und K_m ermittelt. In den ersteren sind wie in der Niere zwei Enzyme im sauren pH-Bereich aktiv, wodurch Leukozyten für die Diagnose eines Morbus Pompe ungeeignet sind, wenn keine Antikörper gegen das renale Enzym zur Verfügung stehen. Amnionzellen und Fibroblasten besitzen einen etwas höheren Anteil an neutraler α-Glucosidase; ihr pH-Optimum und K_m-Wert liegen etwas über denen der Leber.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahlers, J., Arnold, A., von Döhren, F.R., und Peter, H.W.: Enzymkinetik
G. Fischer Verlag, Stuttgart (1974)

2. Angelini, C., and Engel, A.G.: Comperative study of acid maltase deficiency
Arch. Neurol. 26, 344-349 (1972)

3. Auricchio, F., and Bruni, C.B.: Purification of an acid α-gluclosidase by dextran gel fitration
Biochem. J. 105, 35-38 (1967)

4. Auricchio, F., Bruni, C.B., and Sica, V.: Further purification and characterization of the acid α-glucosidase
Biochem. J. 108, 161-167 (1968)

5. Bakhru-Kishore, R., Desjardius, L., and Kelly, S.: A microfluorometric assay of leucocyte α-1,4-glucosidase
Clin. Chim. Acta 73, 89-92 (1976)

6. Baudhuin, P., Hers, H.G., an Loeb, H.: An electron microscopic and biochemical study of type II glygogenosis
Lab. Invest. 13, 1139-1152 (1964)

7. Belenki, D.M., and Rosenfeld, E.L.: Effect of urea on enzymatic activity and electrophoretic mobility of acid γ-amylase (α-glucosidase)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 443-448 (1972)

8. Belenky, D.M., and Rosenfeld, E.L.: Acid α-glucosidase (γ-amylase) from human liver
Clin. Chim. Acta 60, 397-400 (1975)

9. Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F., und Stork, H.: D-Glucose: Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; in Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl., Band II, S. 1163-1168, Verlag Chemie, Weinheim (1970)

10. Bergmeyer, H.U.: Neue Werte für die molaren Extinktions-Koeffizienten von NADH und NADPH zum Gebrauch im Routine-Laboratorium
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 507-508 (1975)

11. Bischoff, G.: Zum klinischen Bild der Glykogen-Speicherungskrankheit (Glykogenose)
Ztschr. f. Kinderh. 52, 722-726 (1932)

12. Blau, K.: A sensitive semi-automated kinetic assay of α-D-glucosidase for the prenatal diagnosis of type II glycogenosis (Pompe's disease)
J. Inher. Metab. Dis. 1, 85-88 (1978)

13. Brown, B.I., and Brown, D.H.: The subcellular distribution of enzymes in type II glycogenosis and the occurence of an oligo-α-1,4-glucan glucohydrolase in human tissues
Biochim. Biophys. Acta 110, 124-133 (1965)

14. Brown, B.I., and Zellweger, H.: α-1,4-glucosidase activity in leucocytes from the family of two brothers who lack this enzyme in muscle
Biochem. J. 101, 16c-18c (1966)

15. Brown, B.I., Brown, D.H., and Jeffrey, P.L.: Simultaneous absence of α-1,4-glucosidase and α-1,6-glucosidase activities (pH 4) in tissues of children with type II glycogen storage disease
Biochemistry 9, 1423-1428 (1970)

16. Bruni, C.B., Auricchio, F., and Covelli, I.: Acid α-D-glucosidase glucohydrolase from cattle liver: Isolation and properties
J. Biol. Chem. 244, 4735-4742 (1969)

17. Bruni, C.B., Sica, V., Auricchio, F., and Covelli, I.: Further kinetic and structural characterization of the lysosomal α-D-glucosidase glucohydrolase from cattle liver
Biochim. Biophys. Acta 212, 470-477 (1970)

18. Butterworth, J., Sutherland, G.R., Broadhead, D.M., and Bain, A.D.: Lysosomal enzymes of cultured amniotic fluid cells
Clin. Chim. Acta 44, 295-299 (1973)

19. Butterworth, J., and Broadhead, D.M.: Diagnosis of Pompe's disease in cultured skin fibroblasts and primary amniotic fluid cells using 4-methylumbelliferyl-α-D-glucopyranoside as substrate
Clin. Chim. Acta 78, 335-342 (1977)

20. Canal, L., Frattola, L., and Pellegrini, G.: Skeletal muscle glycogenosis type II: Biochemical and electron microscopic investigations of one case
Z. Neurol. 201, 98-108 (1972)

21. Cardiff, R.D.: A histochemical and electron microscopic study of skeletal muscle in a case of Pompe's disease (glycogenosis II)
Pediatrics 37, 249-259 (1966)

22. Carrier, H., Lebel, M., Mathieu, M., Pialat, J., and Devic, M.: Late familial pseudo-myopathic muscular glycogenosis with α-1,4-glucosidase deficiency: Morphological, histoenzymological, and biochemical approach
Pathol. Eur. 10, 51-59 (1975)

23. Carter, J., and Smith, E.E.: The substrate specifity of neutral α-glucosidase from rabbit muscle
Arch. Biochem. Biophys. 155, 82-94 (1973)

24. Cori, G.T.: Biochemical aspects of glycogen deposition disease
Mod. Probl. Paediat. 3, 344-358 (1957)

25. Courtecuisse, V., Royer, P., Habib, R., Monnier, C., et Demos, J.: Glycogénose musculaire par déficit d'α-1,4-glucosidase simulant une dystrophie musculaire progressive: Etude clinique et enzymatique. Microscopie optique et électronique
Arch. Franç. Pédiat. 22, 1153-1164 (1965)

26. Cox, R.P., Douglas, G., Hutzler, J.,Lynfield, J., and Dancis, J.: In-utero detection of Pompe's disease
Lancet I, 893 (1970)

27. Dancis, J., Hutzler, J., Lynfield, J., and Cox, R.P.: Absence of acid maltase in glycogenosis type II (Pompe's disease) in tissue culture
Amer. J. Dis. Child. 117, 108-111 (1969)

28. de Barsy, T., Jacquemin, P., Devos, P., and Hers, H.G.: Rodent and human acid α-glucosidase: Purification, properties and inhibition by antibodies. Investigation in type II glycogenosis
Eur. J. Biochem. 31, 156-165 (1972)

29. de Barsy, T.: La glycogénose type II: Approche thérapeutique
Oyez, Louvain (1976)

30. de Burlet, G., et Sudaka, P.: Purification de la maltase neutre rénale humaine
Biochimie 58, 621-623 (1976)

31. de Burlet, G., et Sudaka, P.: Propriétés catalytiques de l'α-glucosidase neutre du rein humain
Biochimie 59, 7-14 (1977)

32. di Mauro,S., Stern, L.Z., Mehler, M., Nagle, R.B., and Payne, C.: Adult-onset acid maltase deficiency: A postmortem study
Muscle and Nerve 1, 27-36 (1978)

33. di Sant'Agnese, P.A., Andersen, D.H., and Mason, H.H.: Glycogen storage disease of the heart: II. Critical review of the literature
Pediatrics 6, 607-623 (1950)

34. Dixon, M.: The determination of enzyme inhibitor constants
Biochem. J. 55, 170-171 (1953)

35. Dixon, M., and Webb, E.C.: Enzymes, 3rd edition
Longman Group Ltd., London (1979)

36. Dreyfus, J.-C., and Alexandre, Y.: Electrophoretic characterization of acid and neutral amylo-1,4-glucosidase (acid maltase) in human tissues and evidence for two electrophoretic variants in acid maltase deficiency
Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 914-920 (1972)

37. Dreyfus, J.-C., and Poënaru, L.: Alpha-glucosidase in white blood cells with reference to the detection of acid α-1,4-glucosidase deficiency
Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 615-622 (1978)

38. Engel, A.G.: Acid maltase deficiency in adults: Studies in four cases of a syndrome which may mimic muscular dystrophy or other myopathies
Brain 93, 599-616 (1970)

39. Engel, A.G., Gomez, M.R., Seybold, M.E., and Lambert, E.H.: The spectrum and diagnosis of acid maltase deficiency
Neurology 23, 95-106 (1973)

40. Fluharty, A.L., Scott, M.L., Porter, M.T., Kihara, H., Wilson, M.G., and Towner, J.W.: Acid α-glucosidase in amniotic fluid
Biochem. Med. 7, 39-51 (1973)

41. Franzini, C., and Bonini, P.A.: Alpha-glucosidase in human urine
Clin. Chim. Acta 17, 505-510 (1967)

42. Fujimori, K., Hizukuri, S., and Nikuni, Z.: Studies on acid α-1,4-glucosidase from bovine spleen
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 811-816 (1968)

43. Fujimori, K., Fukui, T., and Nikuni, Z.: Multiple forms of α-glucosidase from bovine spleen
Agr. Biol. Chem. 36, 483-489 (1972)

44. Fujimoto, A., Fluharty, A.L., Stevens, R.L., Kihara, H., and Wilson, M.G.: Two α-glucosidases in cultured amniotic fluid cells and their differentiation in the prenatal diagnosis of Pompe's disease
Clin. Chim. Acta 68, 177-186 (1976)

45. Fujimoto, A., and Fluharty, A.L.: The change in the pH 4 and pH 6 forms of α-glucosidase in cultured amniotic fluid cells and its implication in prenatal diagnosis of Pompe's disease
Clin. Chim. Acta 90, 157-161 (1978)

46. Galjaard, H., Mekes, M., de Josselin de Jong, J.E. and Niermeijer, M.F.: A method for rapid prenatal diagnosis of glycogenosis II (Pompe's disease)
Clin. Chim. Acta 49, 361-375 (1973)

47. Galjaard, H., van Hoogstraten, J.J., de Josselin de Jong, J.E., and Mulder, M.P.: Methodology of the quantitative cytochemical analysis of single or small numbers of cultured cells
Histochem. J. 6, 409-429 (1974)

48. Gamklou, R., and Scherstén, T.: Activity of α-amylase and α-1,4-glucosidase in human liver tissue
Scand. J. clin. Lab. Invest. 30, 201-207 (1972)

49. Gamklou, R., and Scherstén, T.: Activity of α-amylase and α-1,4-glucosidase in subfractions of human liver homogenates
Scand. J. clin. Lab. Invest. 30, 209-213 (1972)

50. Hernandez, A., Marchesi, V., Goldring, D., Kissane, J., and Hartmann, A.F.: Cardiac glycogenosis: Hemodynamic, angiocardiographic, and electron microscopic findings - report of a case
J. Pediat. 68, 400-412 (1966)

51. Hers, H.G.: α-glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease (Pompe's disease)
Biochem. J. 86, 11-16 (1963)

52. Hirschhorn, K., Nadler, H.L., Waithe, W.I., Brown, B.I., and Hirschhorn, R.: Pompe's disease: Detection of heterozygotes by lymphocyte stimulation
Science 166, 1632-1633 (1969)

53. Hudgson, S., Gardner-Medwin, D., Worsfold, M., Pennington, R.J.T., and Walton, J.N.: Adult myopathy from glycogen storage disease due to acid maltase deficiency
Brain 91, 435-462 (1968)

54. Hudgson, P., and Fulthorpe, J.J.: The pathology of type II skeletal muscle glycogenosis: A light and electron-microscopic study
J. Path. 116, 139-147 (1975)

55. Hug, G., and Schubert, W.K.: Glycogenosis type II: Glycogen distribution in tissues
Arch. Path. 84, 141-152 (1967)

56. Hug, G., and Schubert, W.K.: Lysosomes in type II glycogenosis: Changes during administration of extract from aspergillus niger
J. Cell Biology 35, C1-C6 (1967)

57. Hug, G., Schubert, W.K., and Soukup, S.: Prenatal diagnosis of type II glycogenosis
Lancet I, 1002 (1970)

58. Hug, G., Schubert, W.K., and Soukup, S.: Treatment related observations in solid tissues, fibroblast cultures and amniotic fluid cells of type II glycogenosis, Hurler disease and metachromic leukodystrophy
Birth Defects 9, 160-183 (1973)

59. Hug, G.: Enzyme therapy and prenatal diagnosis in glycogenosis type II
Am. J. Dis. Child. 128,607-609 (1974)

60. Huijing,F., van Creveld, S., and Losekoot, G.: Diagnosis of generalized glycogen storage disease (Pompe's disease)
J. Pediat. 63, 984-987 (1963)

61. Jeffrey, P.L., Brown, D.H., and Brown, B.I.: Studies of lysosomal α-glucosidase: I. Purification and properties of the rat liver enzyme
Biochemistry 9, 1403-1415 (1970)

62. Jeffrey, P.L., Brown, D.H., and Brown, B.I.: Studies of lysosomal α-glucosidase: II. Kinetics of action of the rat liver enzyme
Biochemistry 9, 1416-1422 (1970)

63. Kölmel, H.W., Assmus, H., und Seiler, D.: Myopathie bei Saure-Maltase-Mangel: Die Pompesche Erkrankung im Jugend- und Erwachsenenalter
Arch. Psychiat. Nervenkr. 218, 93-106 (1974)

64. Koster, J.F., Slee, R.G., and Hülsmann, W.C.: The use of leucocytes as an aid in the diagnosis of a variant of glycogen storage disease type II (Pompe's disease)
Europ. J. clin. Invest. 2, 467-471 (1972)

65. Koster, J.F., Slee, R.G., Hülsmann, W.C.,and Niermeijer, M.F.: The electrophoretic pattern and activities of acid and neutral maltase of cultivated fibroblasts and amniotic fluid cells from controls and patients with the variant of glycogen storage disease type II (Pompe's disease)
Clin. Chim. Acta 40, 294-297 (1972)

66. Koster, J.F., Slee, R.G., and Hülsmann, W.C.: The use of leucocytes as an aid in the diagnosis of glycogen storage disease type II (Pompe's disease)
Clin. Chim. Acta 51, 319-325 (1974)

67. Koster, J.F., Slee, R.G., van der Klei-van Moorsel, J.M., Rietra, P.J.G.M., and Lucas, C.J.: Physico-chemical and immunological properties of acid α-glucosidase from various human tissues in relation to glycogenosis type II (Pompe's disease)
Clin. Chim. Acta 68, 49-58 (1976)

68. Koster, J.F., and Slee, R.G.: Some properties of human liver acid α-Glucosidase
Biochim. Biophys. Acta 482, 89-97 (1977)

69. Koster, J.F., Busch, H.F.M., Slee, R.G., and van Weerden, T.W.: Glycogenosis type II: The infantile- and late-onset acid maltase deficiency observed in one family
Clin. Chim. Acta 87, 451-453 (1978)

70. Laidler, K.J., and Bunting, P.S.: The chemical kinetics of enzyme action, 2nd edition
Claredon Press, Oxford (1973)

71. Lejeune, N., Thinès-Sempoux, D., and Hers, H.G.: Tissue fractionation studies: Intracellular distribution and properties of α-glucosidase in rat liver
Biochem. J. 86, 16-21 (1963)

72. Lenard, H.G., Schaub, J., Keutel, J., and Osang, M.: Electromyography in type II glycogenosis
Neuropädiatrie 5, 410-424 (1974)

73. Lineweaver, H., and Burk, D.: The determination of enzyme dissociation constants
J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934)

74. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.H., Farr, A.L., and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

75. McIlvaine, T.C.: A buffer solution for colorimetric comparison
J. Biol. Chem. 49, 183-186 (1921)

76. Mehler, M., and di Mauro, S.: Late-onset acid maltase deficiency: Detection of patients and heterozygotes by urinary enzyme assay
Arch. Neurol. 33, 692-695 (1976)

77. Mehler, M., and di Mauro, S.: Residual acid maltase activity in late-onset acid maltase deficiency
Neurology 27, 178-184 (1977)

78. Michaelis, L., und Menten, M.L.: Die Kinetik der Invertinwirkung
Biochem. Z. 49, 333-369 (1913)

79. Minamiura, N., Umeki, K., Tsujino, K., and Yamamoto, T.: Crystallization of an α-amylase und evidence for the presence of a glucose-forming enzyme in human urine
J. Biochem. 72, 1295-1298 (1972)

80. Murray, A.K., Brown, B.I., and Brown, D.H.: The molecular heterogeneity of purified human liver lysosomal α-glucosidase (acid α-glucosidase)
Arch. Biochem. Biophys. 185, 511-524 (1978)

81. Nadler, H.L., and Hsia, D.Y.-Y.: Utilization of white blood cells for study of clinical genetic disorders
Clin. Biochem. 1, 192-199 (1968)

82. Nadler, H.L.: Patterns of enzyme development utilizing cultivated human fetal cells derived from amniotic fluid
Biochem. Genet. 2, 119-126 (1968)

83. Nadler, H.L., and Gerbie, A.B.: Enzymes in noncultured amniotic fluid cells
Am. J. Obstet. Gynec. 103, 710-712 (1969)

84. Nadler, H.L., and Messina, A.M.: In-utero detection of type II glycogenosis (Pompe's disease)
Lancet II, 1277-1278 (1969)

85. Nadler, H.L., Bigley, R.H., and Hug, G.: Prenatal detection of Pompe's disease
Lancet II, 369-370 (1970)

86. Nadler, H.L.: Tissue culture and antenatal detection of molecular diseases
Biochimie 54, 677-681 (1972)

87. Nelson, P.V., Carey, W.F., and Pollard, A.C.: A microradiochemical assay for α-1,4-glucosidase and its use in the assessment of type II glycogenosis (Pompe's disease)
Clin. Chim. Acta 77, 337-342 (1977)

88. Niermeijer, M.F., Koster, J.F., Jahodova, M., Fernandes, J., Heukels-Dully, M.J., and Galjaard, H.: Prenatal diagnosis of type II glyogenosis (Pompe's disease) using microchemical analyses
Pediat. Res. 9, 498-503 (1975)

89. Nitowsky, H.M., and Grunfeld, A.: Lysosomal α-glucosidase in type II glycogenosis: Activity in leucocytes and cell cultures in relation to genotypes
J. Lab. Clin. Med. 69, 472-484 (1967)

90. Palmer, T.N.: The substrate specifity of acid α-glucosidase from rabbit muscle
Biochem. J. 124, 701-711 (1971)

91. Palmer, T.N.: The maltase, glucoamylase and transglucosylase activities of acid α-glucosidase from rabbit muscle
Biochem. J. 124, 713-724 (1971)

92. Pena, S.D.J., Quilliam, N.M., Hamerton, J.L., and Wrogemann, K.: Searching for molecular abnormalities in genetic diseases by the use of a double labeling technique: II. Deficiency of a basic protein in fibroblasts of patients with Pompe's disease
Pediat. Res. 12, 894-898 (1978)

93. Pilz, H.,Goebel, H.H., Stefan, H., Seidel, D., und Kohlschütter, A.: Biochemisch-diagnostische Kriterien bei Glycogenose Typ II (Saure-Maltase-Defekt)
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 705-708 (1977)

94. Pompe, J.C.: Over idiopatische hypertrophie van het hart
Ned. Tijdsch. Geneesk. 76, 304-311 (1932)

95. Pongratz, D., Schlossmacher, I., Koppenwallner, C., und Hübner, G.: An especially mild myopathic form of glycogenosis type II: Problems of clinical and light microscopic diagnosis
Pathol. Eur. 11, 39-44 (1976)

96. Potier, M., Dallaire, L., and Melançon, S.B.: Occurence and properties of fetal intestinal glycosidases (disaccharidases) in human amniotic fluid
Biol. Neonate 27, 141-152 (1975)

97. Potter, V.R., and Elvehjem, C.A.: A modified method for the study of tissue oxidations
J. Biol. Chem. 114, 495-504 (1936)

98. Putschar, W.: Über angeborene Glykogenspeicherkrankheit des Herzens - "Thesaurismosis glycogenica" (v. Gierke)
Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path. 90, 222-232 (1932)

99. Quintart, J.: Purification et proprietes de l'α-glucosidase acide humaine
Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Licencié en Sciences
Universite Catholique de Louvain, Faculte des sciences, Unité de Biochimie (1973)

100. Reuser, A.J.J., Koster, J.F., Hoogeveen, A., and Galjaard, H.: Biochemical, immunological and cell genetic studies in glycogenosis type II
Am. J. Hum. Genet. 30, 132-143 (1978)

101. Roth, J.C., and Williams, H.E.: The muscular variant of Pompe's disease
J. Pediat. 71, 567-573 (1967)

102. Salafsky, I.S., and Nadler, H.L.: α-1,4-glucosidase activity in Pompe's disease
J. Pediat. 79, 794-798 (1971)

103. Salafsky, I.S., and Nadler, H.L.: A flourometric assay of α-glucosidase and its application in the study of Pompe's disease
J. Lab. Clin. Med. 81, 450-454 (1973)

104. Salafsky, I.S., and Nadler, H.L.: Deficiency of acid α-glucosidase in the urine of patients with Pompe's disease
J. Pediat. 82, 294-297 (1973)

105. Schaub, J., Gutmann, I., and Lippert, H.: Developmental changes of glucolytic and gluconeogenic enzymes in fetal and neonatal rat liver
Horm. Metab. Res. 4, 110-119 (1972)

106. Schaub, J.: Hereditäre Defekte im Glykogen-Stoffwechsel: Ontogenese, physiologische Variationen, ethnologische Untersuchungen
Fortschr. Med. 92 (Nr. 32), 1318 (1974)

107. Schaub, J., Osang. M., von Bassewitz, D.B., Grote, W., Terinde, R., Lombeck, I., und Bremer, H.J.: Pränatale Diagnose einer Glykogenose Typ II (Pompe) mit nachfolgender Interruptio
Dtsch. med. Wschr. 99, 2219-2222 (1974)

108. Schlenska, G.K., Heene, R., Spalke, G., and Seiler, D.: The symptomatology, morphology and biochemistry of glycogenosis type II (Pompe) in the adult
J. Neurol. 212, 237-252 (1976)

109. Schram, A.W., Brouwer-Kelder, B., Donker-Koopman, W.E., Loonen, C., Hamers, M.N., and Tager, J.M.: Use of immobilized antibodies in investigating acid α-glucosidase in urine in relation to Pompe's disease
Biochim. Biophys. Acta 567, 370-383 (1979)

110. Segel, I.H.: Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems
John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto (1975)

111. Shin-Buehring, Y.S., Drefers, M., Kroenner, H., Osang, M., and Schaub, J.: Separation of acid and neutral α-glucosidase isoenzymes from fetal and adult tissues, cultivated fibroblasts and amniotic fluid cells by DEAE-cellulose and Sephadex G-100 column chromatography
Clin. Chim. Acta 89, 393-404 (1978)

112. Soyama, K., Ono, E., Shimada, N., Tanaka, K., and Kusunoki, T.: Urinary α-glucosidase analysis for the detection of the adult form of Pompe's disease
Clin. Chim. Acta 77, 61-67 (1977)

113. Soyama, K., Ono, E., Shimada, N., Tanaka, K., Oya, N., and Kusunoki, T.: Properties of the α-glucosidase from various human tissues in relation to glycogenosis type II (Pompe's disease)
Clin. Chim. Acta 78, 473-478 (1977)

114. Spears, G., Sneyd, J.G.T., and Loten, E.G.: A method for deriving kinetic constants for two enzymes acting on the same substrate
Biochem. J. 125, 1149-1151 (1971)

115. Sprague, H.B., Bland, E.F., and White, P.D.: Congenital idiopathic hypertrophy of the heart: A case with unusual family history
Am. J. Dis. Child. 41, 877-886 (1931)

116. Stave, U. (ed.): Physiology of the perinatal period, vol. 1, chapter 17: Enzyme development in the liver
Meredith Corporation, New York (1970)

117. Stefan, H., Böker, D.-K., Müller, J., und Gullotta, F.: Glyocgenose Typ II (Morbus Pompe) als Myopathie des Erwachsenen
Dtsch. med. Wschr. 102, 1512-1514 (1977)

118. Steinitz, K., and Rutenberg, A.: Tissue α-glucosidase activity and glycogen content in patients with generalized glycogenosis
Isr. J. Med. Sci. 3, 411-421 (1967)

119. Stevenson, F.K.: The disaccharidase activity of a membrane fraction obtained from the rabbit renal cortex
Biochim. Biophys. Acta 266, 144-153 (1972)

120. Swaiman, K.F., Kennedy, W.R., and Sauls H.S.: Late infantile acid maltase deficiency
Arch. Neurol. 18, 642-648 (1968)

121. Swallow, D.M., Corney, G., Harris,H., and Hirschhorn, R.: Acid α-glucosidase: A new polymorphism in man demonstrable by "affinitiy" electrophoresis
Ann. Hum. Genet., Lond. 38, 391-406 (1975)

122. Teng, Y.S., and Tan, S.G.: Acid α-glucosidase in Malaysians: Population studies and the occurence of a new variant
Hum. Hered. 29, 2-4 (1979)

123. Tomm, G.: Über die kinetischen Eigenschaften verschiedener Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in der Leber fötaler und neugeborener Ratten
Dissertation, Fachbereich Medizin, Ludwig-Maximilians-Universtität München (1976)

124. Torres, H.N., and Olavarria, J.M.: Liver α-glucosidases
J. Biolog. Chem. 239, 2427-2434 (1964)

125. Ushakova, N.A., and Lukomskaya, I.S.: α-glucosidase from human kidneys
Biochemistry (translated from Biokhimiya, USSR) 41, 1077-1084 (1976)

126. van Hoof, F., Hue, L., de Barsy, T., Jacquemin, P., Devos, P. , and Hers, H.G.: Glycogen storage diseases
Biochimie 54, 745-751 (1972)

127. von Bassewitz, D.B., Bremer, H.J., Bourgeois, M., Gröbe, H., and Stoermer, J.: Vacuolated lymphocytes in type II glycogenosis - a diagnostic approach ?
Eur. J. Pediatr. 127, 1-7 (1977)

128. von Rücker, A.A.: Studien über die kongenitale Glykogenspeicherkrankheit vom Typ II (Morbus Pompe)
Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (1980)

129. Webb, J.L.: Enzyme and metabolic inhibitors, vol. I: General principles of inhibiton
Academic Press, New York and London (1963)

130. Williams, H.E.: α-glucosidase activity in human leucocytes
Biochim. Biophys. Acta 124, 34-38 (1966)

131. Witzleben, C.L.: Renal cortical tubular glycogen localization in glycogenosis type II (Pompe's disease)
Lab. Invest. 20, 424-429 (1969)

132. Wyss, S.R., Koster, J.F., and Hülsmann, W.C.: Choice of leucocyte preparation in the diagnosis of glycogen storage disease type II (Pompe's disease)
Clin. Chim. Acta 35, 277-280 (1971)

133. Zellweger, H., Brown, B.I., McCormick, W.F., and Tu, J.: A mild form of muscular glycogenosis in two brothers with α-1,4-glucosidase deficiency
Ann. paediat. 205, 413-437 (1965)

LEBENSLAUF

Am 23. Juli 1950 wurde ich in Kraiburg am Inn, Landkreis Mühldorf am Inn als drittes Kind des Zimmermanns Jakob Unterreithmeier und seiner Frau Maria, geb. Roß, geboren.
Von 1956 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Erharting und erlernte anschließend in dreijähriger Lehrzeit den Beruf eines Betriebsschlossers.
An der Berufsaufbauschule Mühldorf erwarb ich 1970 die Mittlere Reife.
Im Oktober 1970 trat ich in das Bayernkolleg Augsburg ein, wo ich im März 1973 das Abitur ablegte.
Ab dem Sommersemester desselben Jahres begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Medizin.
Am 16. Mai 1979 bestand ich in München erfolgreich die Ärztliche Prüfung. Die Approbation als Arzt wurde mir am 1. Juni1979 erteilt.

Vom Oktober 1979 bis Ende 1980 leistete ich meinen Grundwehrdienst als Truppenarzt beim Jagdbombergeschwader 32 in Lagerlechfeld.

Seit Januar 1981 bin ich als Assistenzarzt auf der inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Schwabmünchen beschäftigt.

Ich bin seit 1974 verheiratet und habe inzwischen drei Kinder.